






**MUTANT LACTIC BACTERIA WITH A CAPACITY FOR OVEREXPRESSING AT LEAST ONE PEPTIDASE**






**Patent number:** WO0129183  
**Publication date:** 2001-04-26  
**Inventor:** GUEDON ERIC (FR); ANBA-MONDOLONI JAMILA (FR); DELORME CHRISTINE (FR); RENAULT PIERRE (FR)  
**Applicant:** AGRONOMIQUE INST NAT RECH (FR); GUEDON ERIC (FR); ANBA MONDOLONI JAMILA (FR); DELORME CHRISTINE (FR); RENAULT PIERRE (FR)  
**Classification:**  
- **International:** C12N1/20; C12Q1/68; A23C19/032  
- **europaean:** C07K14/315; C12N9/52  
**Application number:** WO2000FR02869 20001013  
**Priority number(s):** FR19990012924 19991015

**Also published as:**

 WO0129183 (A3)  
 EP1222250 (A3)  
 EP1222250 (A2)  
 US2003040049 (A1)  
 FR2799766 (A1)

more &gt;&gt;

**Cited documents:**

 XP002141676  
 XP002141677  
 XP002160377  
 XP002160389  
 XP000914826

**Report a data error here****Abstract of WO0129183**

The invention relates to mutants of lactic bacteria such as *L. lactis* or *S. thermophilus* which can overexpress one or more peptidases, characterised in that at least one of the negative regulation factors of at least one of the peptidase genes of said bacteria is inactivated, said negative regulation factor being selected from a group comprising the gene *codY*, the genes of the operon *lev*, and a gene coding for a protein that is homologous with a beta -glucosidase.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
26 avril 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/29183 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 1/20,  
C12Q 1/68, A23C 19/032

[FR/FR]; 9, rue Magellan, F-78180 Montigny-le-Breton-  
neux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02869

(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de  
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:  
13 octobre 2000 (13.10.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/12924 15 octobre 1999 (15.10.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE -INRA- [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-  
versité, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): GUEDON,  
Eric [FR/FR]; 26, rue Jules Ferry, F-92100 Boulogne  
(FR). ANBA-MONDOLONI, Jamila [FR/FR]; 13, rue  
Charles Linné, F-78180 Montigny-le-Bretonneux (FR).  
DELORME, Christine [FR/FR]; 15, résidence des Basses  
Garennes, F-91120 Palaiseau (FR). RENAULT, Pierre

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: MUTANT LACTIC BACTERIA WITH A CAPACITY FOR OVEREXPRESSING AT LEAST ONE PEPTIDASE

(54) Titre: BACTERIES LACTIQUES MUTANTES CAPABLES DE SUREXPRESSER AU MOINS UNE PEPTIDASE

(57) Abstract: The invention relates to mutants of lactic bacteria such as *L. lactis* or *S. thermophilus* which can overexpress one or more peptidases, characterised in that at least one of the negative regulation factors of at least one of the peptidase genes of said bacteria is inactivated, said negative regulation factor being selected from a group comprising the gene *codY*, the genes of the operon *lev*, and a gene coding for a protein that is homologous with a  $\beta$ -glucosidase.

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte à des mutants de bactéries lactiques, comme *L. lactis* ou *S. thermophilus* capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase.

WO 01/29183 A2

BACTERIES LACTIQUES MUTANTES CAPABLES DE  
SUREXPRIMER AU MOINS UNE PEPTIDASE.

5 La présente invention concerne des mutants de  
bactéries lactiques, comme *Lactococcus lactis*, capables de  
surexprimer au moins une et de préférence plusieurs  
peptidases. Ces mutants présentent des activités  
peptidolytiques fortes qui permettent d'accélérer la  
10 dégradation de la caséine en acides aminés. Ces mutants  
sont donc tout particulièrement utiles pour augmenter la  
vitesse d'affinage des fromages car les acides aminés sont  
des précurseurs dans la synthèse d'arômes. L'invention  
concerne également une méthode d'identification de ces  
mutants et les constructions génétiques pour la mise en  
15 œuvre de cette méthode. L'invention concerne enfin  
l'utilisation de ces bactéries mutantes dans un procédé de  
fabrication et/ou de maturation de fromages.

20 *Lactococcus lactis* possède un système  
protéolytique complexe pour dégrader les protéines du lait  
et en particulier la caséine. La caséine est la protéine  
majoritaire du lait qui fournit tous les acides aminés  
nécessaires à la croissance (12). La caséine est dégradée  
en oligopeptides par une protéase de paroi. Ces  
25 oligopeptides entrent dans la cellule par des systèmes de  
transport spécifiques puis sont hydrolysés en acides aminés  
à l'intérieur de la cellule par des peptidases (14). En  
plus de leur rôle dans la nutrition azotée de *L. lactis*,  
les peptidases pourraient avoir également un rôle important  
30 dans le développement des saveurs lors de l'affinage de  
certains fromages.

Dix gènes de peptidases ont été clonés et leurs  
produits caractérisés biochimiquement chez *L. lactis*. Elles  
sont regroupées dans différentes classes suivant la  
35 position et la nature de la liaison peptidique qu'elles

hydrolysent et ont souvent une spécificité large (14). A l'heure actuelle, peu d'études sur la régulation de l'expression de ces peptidases chez *L. lactis* ont été menées et seule la régulation de la protéase de paroi a été  
5 étudiée de manière approfondie (18, 19).

Or, l'expression de certains gènes chez *Lactococcus lactis* peut être critique lors de procédés de fabrication de fromages. Aussi, les Inventeurs ont considéré que l'évaluation du niveau d'expression de ces  
10 gènes peut se faire en déterminant l'efficacité de leurs promoteurs car la transcription est un des paramètres qui contrôle l'expression des gènes. Les Inventeurs ont donc développé dans le cadre de la présente invention des outils basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs. Ils ont  
15 construit des vecteurs adaptés à l'étude systématique de nombreux promoteurs dans différents contextes cellulaires et environnementaux et qui peuvent être transférés aisément dans un grand nombre de souches de *L. lactis*. Ces vecteurs ont été utilisés pour étudier la variabilité de  
20 l'expression des enzymes du système protéolytique de *L. lactis*. L'expression de seize gènes codant pour des enzymes impliquées dans la protéolyse de la souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ainsi que les deux gènes de la protéase de paroi des souches WG2 et SK11 a pu ainsi  
25 être caractérisée, soit grâce aux vecteurs développés par les Inventeurs, soit grâce à la détection des ARN messagers par la technique de Northern-blot (8).

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention sur la caractérisation de l'expression  
30 des gènes codant pour des peptidases, des protéases et des protéines de transport de *L. lactis* ont permis de mettre en évidence une régulation coordonnée de leur expression et ainsi de déterminer les facteurs pouvant affecter cette expression. Les Inventeurs ont notamment réalisé une étude

systematique de la transcription des seize gènes ci-dessus impliqués dans la protéolyse.

Il a ainsi été montré que la transcription de 8 des seize gènes testés est régulée et réprimée simultanément par des dipeptides via le pool intracellulaire d'acides aminés branchés : isoleucine, leucine et valine. Il s'agit des promoteurs des gènes des peptidases suivants :

- *prtP*, qui est la protéase de paroi (14), et plus particulièrement *prtPWG* qui est une protéase de paroi isolée de la souche WG2, et *prtPSK11*, qui est une protéase de paroi isolée de la souche SK11,

- *pepN* et *pepC*, qui sont les aminopeptidases de spécificité générale majeure dans la cellule (14),

- *pepO*, qui est une endopeptidase impliquée dans la dégradation des oligopeptides (14),

- *opp*, qui est l'opéron codant pour le système d'entrée des oligopeptides (14),

- *dtpt*, qui code pour une protéine de transport des di et tripeptides hydrophiles (14),

- *pepDA2*, qui code pour une dipeptidase générale.

Il a aussi été montré dans le cadre des travaux ayant conduit à la présente invention que la transcription des gènes du système protéolytique chez *L. lactis* est régulée par les produits de divers gènes. On peut citer tout particulièrement le gène *codY* qui constitue un régulateur central réprimant la transcription des gènes du système protéolytique chez *L. lactis*. On peut encore citer l'un des gènes de l'opéron *lev* et un gène codant pour une  $\beta$ -glucosidase.

Les Inventeurs ont donc mis en œuvre une stratégie de mutagenèse aléatoire, appliquée à la souche MG1363 (21), pour trouver des régulateurs de la transcription de ces peptidases. La fusion du second

promoteur de l'opéron *opp-pepO* (*PpepOA*) au gène de la  $\beta$ -galactosidase a servi de rapporteur pour visualiser des mutants dont la transcription de ce promoteur est dérégulée. Les inventeurs ont ainsi isolé des mutants de *L.*  
5 *lactis*, obtenus par insertion d'un transposon.

La présente invention a donc pour objet des mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au  
10 moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé.

Il peut s'agir d'une inactivation totale ou partielle. On entend par inactivation totale, le fait que ledit facteur n'est pas du tout exprimé, et par  
15 inactivation partielle, le fait que que ledit facteur est encore exprimé mais pas suffisamment pour observer l'effet de régulation négative rencontré chez une bactérie non mutée.

L'invention concerne tout particulièrement, des  
20 mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le  
25 groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase.

Comme indiqué précédemment, ladite inactivation peut être totale ou partielle.

Une première forme de réalisation d'une telle  
30 inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN de l'un desdits gènes ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Une seconde forme de réalisation d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine  
35 cofacteur nécessaire à l'activité de l'un desdits gènes

et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

A titre de bactéries lactiques mutantes selon l'invention, on peut citer plus particulièrement des mutants de *L. lactis* et de *S. thermophilus*.

On entend tout particulièrement par mutants de bactéries lactiques selon l'invention, des bactéries génétiquement modifiées de façon à ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes desdites peptidases est inactivé totalement ou partiellement. Ainsi, on entend par inactivation, la modification d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines constituant un ou plusieurs facteurs de régulation négative des gènes des peptidases, comme par exemple CODY, ou la modification d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines nécessaires auxdits facteurs de régulation négative des gènes des peptidases, comme par exemple les éléments de transport des acides aminés branchés ou une protéine nécessaire à l'activité de CODY. Les mutants de bactéries lactiques selon l'invention sont donc avantageusement obtenus par mutagenèse.

L'invention se rapporte plus particulièrement à des mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative commun à plusieurs gènes desdites peptidases est inactivé.

L'invention concerne plus particulièrement des mutants de bactéries lactiques et notamment de *Lactococcus lactis* dont l'un au moins des facteurs de régulation négative de la transcription, commun à deux au moins et de préférence trois des promoteurs des gènes de peptidases, est inactivé.

Les promoteurs des gènes de peptidases dont l'un au moins des facteurs de régulation négative de la

transcription est inactivé, sont par exemple choisis parmi les gènes *prtP*, *pepN*, *pepC*, *pepX*, *pepO*, *pepDA2*, *dtpT* et l'opéron *opp*.

5 Il sera fait référence dans ce qui suit à la liste de séquences en annexe dans laquelle :

- SEQ ID No. 1 représente la séquence du gène *codY* de *L. lactis* MG1363.

10 - SEQ ID No. 2 représente la séquence du gène *dtpT* *L. lactis* MG1363.

- SEQ ID No. 3 représente la séquence du gène *secA* de *L. lactis* IL1403.

- SEQ ID No. 4 représente la séquence du gène *secY* de *L. lactis* IL1403.

15 - SEQ ID No. 5 représente la séquence de l'opéron *lev* de *L. lactis* IL1403.

- SEQ ID No. 6 représente un fragment de séquence d'un gène de *L. lactis* MG1363 dont le produit est homologue à une  $\beta$ -glucosidase.

20 - SEQ ID No. 7 représente la séquence du gène de *L. lactis* MG1363 dont le produit est homologue à une formate déshydrogénase.

- SEQ ID No. 8 représente une partie de la séquence du gène *codY* de *S. thermophilus*.

25 - SEQ ID No. 9 représente la séquence complète du gène *codY* de *S. thermophilus*.

30 Un premier facteur de régulation négative des peptidases de bactéries lactiques notamment de *L. lactis* identifié par les Inventeurs est constitué par le pool intracellulaire d'acides aminés branchés qui répriment la transcription de plusieurs gènes de peptidase. Un premier type de mutants est donc caractérisé par la modification de ce pool intracellulaire d'acides aminés branchés. On entend  
35 de préférence par modification, une diminution de la



quantité d'acides aminés branchés. Un exemple de modification du pool d'acides aminés branchés consiste à modifier sélectivement leur entrée dans la cellule, notamment en bloquant l'un au moins des systèmes de transport :

- des acides aminés,
- des di- et tripeptides,
- des oligopeptides.

Des mutants de *L. lactis* dont l'un au moins des systèmes de transport des acides aminés branchés, des di- et tripeptides ou des oligopeptides sont bloqués sont des mutants dans lesquels l'un au moins des gènes codant pour un élément de ces systèmes de transport est inactivé.

Des mutants d'un système de transport des dipeptides et tripeptides ont été obtenus par mutagenèse aléatoire dans le gène *dtpT* (10) de *L. lactis* dont la séquence est donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. 2. Les travaux réalisés dans l'art antérieur sur ce gène n'ont jamais mis en évidence qu'il pouvait s'agir de mutants de *Lactococcus lactis* capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases. Un exemple de gène *dtpT* modifié dans un mutant est caractérisé par l'insertion par exemple du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 280 et 470 dans la séquence SEQ ID No. 2.

La répression de la transcription des gènes codant pour les peptidases est levée chez les mutants de l'invention et peut résulter comme indiqué précédemment de la variation du pool intracellulaire des acides aminés branchés. La variation du pool intracellulaire des acides aminés branchés peut également provenir de la variation de la dégradation desdits peptides (di, tri ou oligopeptides). En conséquence, des mutants de bactéries lactiques et plus particulièrement de *L. lactis* sont des mutants dans lesquels l'un au moins des gènes codant les peptidases

responsables de la dégradation de ces dipeptides, tripeptides ou oligopeptides est inactivé.

Un facteur important de régulation négative  
5 identifié par les inventeurs est le produit du gène *codY* qui réprime la transcription de plusieurs peptidases au niveau de leur promoteur. En effet, les inventeurs ont obtenu par mutagenèse des mutants de *L. lactis* inactivés dans un gène qui est homologue au gène *codY* de *Bacillus subtilis*.  
10 Chez un mutant *codY* reconstruit par les inventeurs par mutagenèse dirigée, il a été observé que la transcription du gène *pepOA* et la transcription d'au moins trois gènes de peptidases ne sont plus réprimés par les dipeptides. Ainsi, l'inactivation du gène *codY* chez  
15 *L. lactis* permet d'augmenter l'expression des gènes de plusieurs peptidases d'un facteur 4 à 55 dans un milieu contenant une source de peptides qui normalement les répriment dans la souche sauvage.

La séquence d'ADN du gène *codY* de *L. lactis* et  
20 de la séquence de la protéine *codY* pour lequel il code sont représentées dans SEQ ID No. 1 en annexe.

Les inventeurs ont également mis en évidence la présence du gène *codY* chez *S. thermophilus*, qui est comme  
25 *L. Lactis* une bactérie lactique. La séquence d'ADN partielle du gène *codY* de *S. thermophilus* et la séquence de la protéine pour lequel il code sont représentées dans SEQ ID No. 8 en annexe. La séquence d'ADN complète du gène *codY* de *S. thermophilus* et la séquence de la protéine pour lequel il code sont représentées dans SEQ ID No. 9 en  
30 annexe. Ainsi l'inactivation complète ou partielle du gène *codY* chez les autres bactéries lactiques (*Streptocoque*, *Lactobacille*, *Pediocoque*, *Leuconostoc*) pourrait également permettre d'augmenter l'expression des peptidases.

En conséquence, un type préféré de mutants de  
35 bactéries lactiques selon l'invention, plus

particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation du gène *codY*. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN du gène *codY*, tout particulièrement des séquences SEQ ID No. 1, 8 ou 9 en annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité du gène *codY* et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Comme indiqué précédemment, dans les bactéries mutantes pour *codY* de l'invention l'expression d'au moins 3 peptidases est augmentée de 4 à 55 fois dans un milieu contenant une source de peptides qui normalement répriment leur expression. Une bactérie mutante pour *codY* selon l'invention interrompt la cascade de régulation qui conduit à la répression des peptidases via le pool de peptides du milieu extérieur. Un changement de la séquence d'ADN dans le gène *codY* ou dans sa séquence de régulation consiste par exemple en une mutation ou une délétion qui peuvent être réalisées par des méthodes bien connues de mutagenèse. Ainsi les inventeurs ont répertorié 13 mutants de *codY* avec par exemple une insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 87, 112, 122, 289, 313, 409, 575, 604, 641, 693, 821, 877 et 882 dans la séquence SEQ ID No. 1.

Comme indiqué précédemment, d'autres mutants de bactéries lactiques, notamment de *L. lactis*, capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases ont été caractérisés par les Inventeurs. Il s'agit de mutants dans lesquels l'un au moins des facteurs de régulation négative de la transcription d'un ou plusieurs gènes desdites

peptidases est inactivé. A titre d'exemples de tels mutants, on peut citer :

- Les mutants dans lesquels un gène codant pour des protéines impliquées dans la sécrétion des protéines de transport des dipeptides ou tripeptides est inactivé. Il s'agit plus particulièrement de mutants dont l'un au moins des gènes *secA* (3) et *secY* (13) est modifié. Les protéines codées par ces gènes pourraient intervenir dans la translocation de la protéine DtpT qui est impliquée dans le transport des di- et tripeptides. Les séquences des gènes *secA* et *secY* de *L. lactis* sont données dans la liste de séquences en annexe respectivement sous les numéros SEQ ID No. 3 et SEQ ID No. 4. Des mutants pour *secA* ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 1689 et 1698 dans la séquence SEQ ID No. 3. Des mutants pour *secY* ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 1273 et 1281 dans la séquence SEQ ID No. 4.

- Les mutants dans lesquels l'un des gènes de l'opéron *lev* est inactivé (17). Les gènes de l'opéron *lev* codent pour un système de transport des sucres. La séquence de l'opéron *lev* de *L. lactis* est donnée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No. 5. Des mutants pour l'opéron *lev* selon l'invention ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 40, 108, 1075, 1140, 1145 et 2735 dans la séquence SEQ ID No. 5.

- Les mutants dans lesquels l'un au moins des gènes présentant une homologie avec un gène codant une protéine dont la structure est du type de celle d'une  $\beta$ -glucosidase et/ou une formate deshydrogénase est inactivé. La séquence d'un gène codant cette protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase est donnée dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID No. 6. La séquence d'un gène

codant une formate deshydrogénase est donnée dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID No. 7.

Comme précédemment, on entend par un gène inactivé un gène dont la séquence ou une séquence impliquée dans son expression ou sa régulation sont modifiées.

En conséquence, un autre type préféré de mutants de bactéries lactiques selon l'invention, plus particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation de l'un des gènes de l'opéron *lev*. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN de l'un des gènes de l'opéron *lev*, tout particulièrement de la SEQ ID No. 5 annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de l'un des gènes de cet opéron. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un des gènes de l'opéron *lev* et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Un troisième type préféré de mutants de bactéries lactiques selon l'invention, plus particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation d'un gène codant pour une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN d'un gène codant pour une  $\beta$ -glucosidase, tout particulièrement de la SEQ ID No. 6 annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité d'un gène codant pour une  $\beta$ -glucosidase et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Bien entendu, les mutants selon l'invention peuvent également être caractérisés par plusieurs des mutations décrites ci-dessus.

5 Comme indiqué précédemment les Inventeurs ont développé dans le cadre de la présente invention des outils basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs comme la luciférase de *Vibrio harveyi*. L'expression de la luciférase qui se détecte par une émission de lumière, permet de  
10 mesurer facilement l'activité des promoteurs y compris dans des milieux complexes (4). Les vecteurs pVar construits par les Inventeurs contiennent une origine de réplication inactivée après intégration, un marqueur d'antibiotique et une partie du gène *cluA* (6). Ce dernier fragment permet au  
15 plasmide de s'intégrer par recombinaison homologue dans le facteur sexuel. Celui-ci est un élément conjugatif de 60 kb présent sous forme intégrée dans le chromosome de certaines souches de *L. lactis*. Les constructions intégrées dans le facteur sexuel au niveau du gène *cluA* dans une souche  
20 peuvent donc être transférées dans de nombreuses souches de *L. lactis* par conjugaison.

L'invention concerne donc aussi, un vecteur recombinant pour identifier ou sélectionner les bactéries mutantes selon l'invention. Ce vecteur est caractérisé en  
25 ce qu'il comprend un gène marqueur fusionné à un gène de peptidase ou un promoteur de de gène, une origine de réplication inactivée après intégration dans la bactérie, un marqueur antibiotique, et une partie du gène *cluA*.

Un tel vecteur permet de distinguer une souche  
30 mutante selon l'invention d'une souche sauvage incapable de surexprimer une ou plusieurs peptidases. Une méthode permettant de distinguer ces souches est par exemple la suivante. Pour connaître le niveau d'expression des peptidases dans des souches, un vecteur pVar contenant le  
35 promoteur *PpepOA* de l'opéron *opp-pepO*, fusionné au gène de

la luciférase, est transféré dans les souches par conjugaison. Les mesures de l'activité luciférase sous le contrôle du *PpepOA* indiquent si la transcription au moins du gène *pepO* est dérégulée dans ces souches. Les constructions avec les autres promoteurs permettent de vérifier le nombre de gènes de peptidases dont la transcription est dérégulée. Les activités luciférases de référence de la souche sauvage qui reflètent la répression de la transcription des gènes de peptidases lors de croissance en présence de peptides, via le pool d'acides aminés branchés, sont répertoriés dans la figure 1.

En conséquence, l'invention concerne également une méthode d'identification ou de sélection d'une bactérie lactique mutante selon l'invention, caractérisée en ce que l'on transfère un gène de peptidase ou un promoteur de ce gène dans une bactérie par conjugaison avec le vecteur défini ci-dessus, puis l'on cultive ladite bactérie en présence de peptides et l'on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur qui reflètent la répression de la transcription des gènes de peptidases.

Avantageusement le gène rapporteur est le gène de la luciférase.

L'invention concerne également l'utilisation des mutants de bactéries lactiques tels que décrits précédemment ou un mélange de ceux-ci dans un procédé de fabrication et/ou de maturation du fromage. De façon avantageuse, les mutants de bactéries lactiques tels que décrits précédemment ou un mélange de ceux-ci sont utilisés dans un procédé de fabrication et/ou de maturation de fromages type pâte molle ou pâte pressée.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent. Ces exemples concernent l'obtention par mutagenèse de mutants

de *L. lactis* selon l'invention, et se réfèrent aux figures en annexe dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'activité luciférase de différentes fusions transcriptionnelles à D.O. 0,4 en milieu chimiquement défini (CDM) acides aminés (AA) et CDM casitone (Cas),

- la figure 2 représente la répression de la transcription en A des promoteurs régulés, et en B des promoteurs non régulés. Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extraction des ARNm totaux de la souche sauvage cultivée en CDM + acides aminés (AA) et CDM + casitone (Cas) à différentes densités optiques (0,2; 0,6; 0,8; 1,2). Les hybridations ont été effectuées avec différentes sondes spécifiques des promoteurs de peptidases. Les promoteurs régulés correspondent à une diminution de l'ARN dans les conditions de croissance en présence de casitone, ce qui est le reflet d'une répression de la transcription.

- La figure 3 est une représentation schématique des différents facteurs intervenant sur l'expression des peptidases de *L. lactis* et ayant permis de concevoir les différents mutants de l'invention.

- La figure 4 est un alignement des séquences des gènes *codY* de *L. lactis* et de *Bacillus subtilis*.

## I - Matériel et Méthodes.

### 1) Souches bactériennes, milieux, vecteurs et manipulations d'ADN.

La souche de *L. lactis* MG1363 a été cultivée à 30°C en milieu M17 glucose. Au besoin, 5µg/ml d'érythromycine sont ajoutés au milieu de culture. Les promoteurs de peptidases à étudier (PepP, PepA, PepF2, PepDA1, PepOA, PepQ, PepX, PepOD, PepM, PepT, PepN et PepC) et les deux promoteurs de l'opéron *opp* (*pepOA/pepOD*) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à



partir du chromosome de la souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Une série de vecteurs à répllication conditionnelle, contenant les gènes rapporteurs de la luciférase de *Vibro harveyi* et un fragment du facteur sexuel (gène *cluA*) a été construite. Le pVar-1 a été utilisé pour fusionner aux gènes luciférase, les fragments d'ADN obtenus par PCR et correspondant aux différents promoteurs.

2) Intégration des fusions transcriptionnelles sur le chromosome de MG1363 et conjugaison.

Après transformation de la souche MG1363 par les plasmides pVar-1 contenant les promoteurs de peptidases, les fusions sont intégrées dans le chromosome par recombinaison homologue, soit au locus promoteur peptidase, soit au locus du facteur sexuel (dans le gène *cluA*). L'identification du locus d'intégration se fait grâce à des amorces appropriées par amplification PCR et par hybridation d'un gel Southern. Le transfert du facteur sexuel se fait par conjugaison entre deux souches (5).

3) Détermination de l'activité luciférase chez *L. lactis*.

Les mesures d'activité luciférase sont effectuées sur le luminomètre Bertold Lumat LB9501. Un millilitre de culture de *L. lactis* est mélangé avec 5µl de nonaldehyde et l'émission de lumière est directement mesurée. La valeur du pic est ramenée à la  $DO_{600nm}$  de la culture et l'activité luciférase est mesurée tout au long de la croissance. L'activité luciférase reportée dans la figure 1 est mesurée à  $DO_{600nm} = 0,4$  et exprimée en  $10^3$  lux/ $DO$ .

4) Milieu Chimiquement Défini (CDM).

Ce milieu chimiquement défini (CDM) est décrit dans Sissler et al. (22). La source d'azote de ce milieu est un mélange d'acides aminés. Dans le "CDM cas", est ajouté un extrait de casitones (caséines du lait dégradées par des enzymes pancréatiques) qui est une source de petits peptides.

#### 5) Constructions: PpepOA- $\beta$ gal.

Le second promoteur de l'opéron *opp-pepO* (PpepOA) de la souche MG1363 a été amplifié par les oligonucléotides suivant (GGGAATTCTTTGGGAACAATGATAA et CGGGATCCGTTACTTCTGAACCA) et le fragment amplifié de 500pb a été cloné dans le plasmide pJIM762 au site *EcoRI-BamHI* en amont du gène de la  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* (E. Guédon, résultats non encore publiés). Ce plasmide, dont le gène de la  $\beta$ -galactosidase est sous le contrôle des signaux d'expressions de PpepOA, a été intégré dans le chromosome de la MG1363 par recombinaison homologue au locus promoteur. La transcription à PpepOA est réprimée par les dipeptides contenu dans la casitone du milieu et la souche contenant la fusion est blanche sur un milieu chimiquement défini (CDM) contenant des casitones. La transcription à PpepOA est dérèprimée sur un milieu CDM contenant des acides aminés comme source d'azote et la souche contenant la fusion est bleue [dans les deux cas la souche est cultivée avec du phospho- $\beta$ -galactoside (P- $\beta$ gal)].

#### 6) Plasmide Pghost8-ISS1.

Ce plasmide à réplication conditionnelle (protéine de réplication thermosensible) possède un marqueur d'antibiotique tétracycline et une séquence d'insertion ISS1 (16). L'augmentation de la température de 30°C à 37°C inhibe la réplication de ce plasmide et les souches résistantes à la tétracycline obtenues contiennent le plasmide intégré dans le chromosome. Il s'intègre de

façon aléatoire dans le chromosome de *L. lactis* par transposition répllicative (16).

7) Mutagenèse par transposition.

Une mutagenèse aléatoire est effectuée avec le plasmide thermosensible pGhost8-ISS1 dans la souche MG1363 contenant la fusion promoteur PpepOA- $\beta$ -gal. En milieu MCD casitone, en présence de P- $\beta$ -gal, sur 50000 clones blancs isolés, 46 présentent un phénotype de couleur bleue. Dans ces mutants l'expression de la fusion  $\beta$ -gal est dérégulée. Le plasmide pGhost8-ISS1 est donc inséré dans un gène dont le produit est un répresseur direct ou indirect de l'expression de PpepOA.

8) Identification des mutants par clonage des jonctions.

La transposition par ISS1 dans le chromosome donne une insertion du pGhost8 entouré d'une copie dupliquée de ISS1. Les jonctions ont été clonées, en utilisant des sites uniques de restriction (*EcoRI* et *HindIII*) présents sur le pGhost8. La digestion du chromosome par ces enzymes permet d'obtenir le plasmide pGhost8 contenant les régions flanquantes. Le site de transposition est ainsi caractérisé par séquençage des jonctions avec les oligonucléotides suivants (pour la jonction *EcoRI* : TCACCTCATATAAATTCCCCA et AAATGGAACGCTCTTCGG) (pour la jonction *HindIII* : CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC et ACCAACAGCGACAATAATCACA).

9) Mutant *codY*.

Une mutagenèse aléatoire a permis d'obtenir entre autre, des mutants *codY* pour lesquels la transcription de plusieurs gènes codant pour des enzymes protéolytiques est dérégulée. L'inactivation de ce gène chez *L. lactis* augmente l'expression des gènes *opp-pepO*,

*pepN* et *pepC* respectivement d'un facteur 55, 14 et 4 en milieu CDM avec casitones où l'expression est normalement réprimée par la source de peptides.

5                    10) Inactivation de *codY* par simple crossing-over.

Un fragment PCR de 540 pb a été amplifié par les oligonucléotides suivants (CAGTATGACTGAACGCTTGGC et GCGATAACATGCCCTTCTTCA) et cloné dans le plasmide pJIM2242.  
10 Ce plasmide est intégré dans le gène *codY* par simple crossing-over et un mutant *codY* est vérifié par une hybridation Southern. Ce mutant a le même phénotype que les mutants *codY* obtenus par mutagenèse.

15                    11) Autres mutants.

La mutagenèse aléatoire a permis d'identifier plusieurs mutants autre que *codY*. Des mutations des gènes *dtpT*, de l'opéron *lev*, *secA*, *secY*, et des gènes codant pour une hélicase, une  $\beta$ -glucosidase et une enzyme homologue à  
20 une formate déshydrogénase ont également conduit à des mutants surexprimant au moins *pepO* ou plusieurs peptidases.

II - Résultats.

25                    1) Construction du vecteur pVar-1.

Des vecteurs intégratifs permettant de suivre l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur sur le chromosome ont été construits. Les gènes de la luciférase de *Vibrio harveyi* ont été utilisés comme  
30 gène rapporteur. L'activité luciférase des fusions transcriptionnelles avec les promoteurs de gènes de peptidases est le reflet de l'expression des gènes de peptidases (11, 20). Un vecteur qui se réplique de façon conditionnelle a été utilisé pour intégrer les fusions  
35 transcriptionnelles sur le chromosome (15). Ce vecteur a

été conçu pour être facilement transférable par conjugaison, en particulier dans des souches industrielles difficilement transformables. Un fragment (gène *cluA*) de l'élément chromosomique de 60kb nommé le facteur sexuel, que possèdent certaines souches de lactocoques, a été introduit dans ce vecteur. Cet élément est capable de s'auto-transférer à une haute fréquence par conjugaison dans l'espèce *L. lactis* (7). En intégrant nos fusions transcriptionnelles dans ce facteur sexuel, celles-ci sont alors transférables à d'autres souches de lactocoques par conjugaison du facteur sexuel. Parmi différents vecteurs construits, le pVar-1 utilisé dans cette étude contient, en plus des composants décrits ci-dessus un gène de résistance à l'érythromycine. Il a été vérifié que les fusions transcriptionnelles intégrées au locus promoteur ou dans le gène *cluA* avec le pVar-1 avaient des activités luciférases identiques (9).

## 2) Expression de fusions avec les promoteurs des gènes codant pour des peptidases.

Les promoteurs de 11 gènes codant pour des peptidases (*pep*) de *L. lactis* MG1363 : *pepA*, *pepC*, *pepDA1*, *pepF2*, *pepM*, *pepN*, *pepP*, *pepQ*, *pepT*, *pepX* ; et les deux promoteurs de l'opéron *opp-pepO* (*PpepOA* et *PpepOD*) dans lequel se trouve le gène *pepO*, ont été clonés, fusionnés au gène *lux* dans le vecteur pVar-1 et intégrés par recombinaison homologue dans le chromosome de *L. lactis* MG1363 au locus des différents promoteurs. Les deux promoteurs de protéase (*prt* des souches WG2 et SK11) sont fusionnés au gène luciférase sur un plasmide. L'expression de ces fusions a été déterminée en milieu CDM et CDM cas et les valeurs des mesures luciférases sont rapportées dans la figure 1. En milieu CDM, selon le taux de luciférase mesuré, les fusions ont été regroupées en différentes classes. La plus forte activité luciférase est obtenue avec

les fusions plasmidiques contenant les promoteurs des gènes *p<sub>prt</sub>* ( $10 \cdot 10^3$  lux/DO ( $10^3$ )). Pour les fusions chromosomiques, la plus forte activité luciférase est obtenue avec les promoteurs *P<sub>pepN</sub>*, *P<sub>pepC</sub>*, *P<sub>pepOA</sub>* et *P<sub>pepOD</sub>* (1 à  $5 \cdot 10 \cdot 10^3$  lux/DO ( $10^3$ )), une activité moyenne est obtenue avec les promoteurs des gènes *pepQ*, *pepX*, *pepM* et *pepT* (200 à 300 lux/DO ( $10^3$ )) et une activité faible est obtenue avec les promoteurs des gènes *pepP*, *pepA*, *pepF2* et *pepDA1* (20 à 80 lux/DO ( $10^3$ )). Il est à remarquer que les niveaux d'expression les plus élevés sont obtenus avec des fusions contenant les promoteurs des gènes codant pour les peptidases de très large spécificité (*pepC*, *pepN*, *pepO*) et pour un système de transport des oligopeptides (*Opp*) qui est essentiel à la croissance des lactocoques en milieu lait. L'expression des gènes de peptidases est diminuée en milieu CDM cas qui contient une source d'azote constituée d'acides aminés et de peptides (figure 1). La force des promoteurs *P<sub>pepP</sub>*, *P<sub>pepA</sub>*, *P<sub>pepF2</sub>*, *P<sub>pepDA1</sub>*, *P<sub>pepQ</sub>*, *P<sub>pepT</sub>* et *P<sub>pepM</sub>* est diminuée de 2 à 3 fois en CDM cas tandis que celle des promoteurs *P<sub>pepX</sub>*, *P<sub>pepC</sub>*, *P<sub>pepN</sub>*, *P<sub>prtPWG2</sub>*, *P<sub>prtPSK11</sub>*, *pepO*, et l'opéron *opp-pepO* est réprimée respectivement 5, 7, 13, 21, 12 et 153 fois par les dipeptides du milieu de culture via le pool d'acides aminés branchés dans la cellule. L'analyse des transcrits par Northern Blot a permis de confirmer les résultats obtenus avec les fusions transcriptionnelles et de montrer que la transcription des gènes *pepDA2* et *dtpT*, mais non celle de *dtpP*, était réprimée par les peptides de la casitone (figure 2).

### 3) Obtention et caractérisation de mutants déréprimés.

Sur un milieu riche en peptides et en présence de P- $\beta$ gal, la souche sauvage contenant la fusion *P<sub>pepOA</sub>- $\beta$ gal* donne des colonies blanches car l'expression de la

fusion est réprimée. Les mutants obtenus donnent des colonies bleues car la fusion fusion *PpepOA-βgal* est déréprimée.

Différents gènes des mutants dans lesquels le pGhost s'est inséré ont été identifiés (*codY*, *dtpT*, l'opéron *lev*, *secA*, *secY*, et les gènes codant pour une β-glucosidase et une enzyme homologue à une formate deshydrogénase (*fdh*)). L'analyse des ARNm par Northern Blot d'une souche mutante cultivée dans un milieu riche en peptides, a confirmé que la transcription du gène *pepO* n'est plus réprimée dans les mutants des gènes *codY*, *dtpT*, *fdh* et l'opéron *lev*. La dérepression de *pepO* dans les mutants des gènes codant pour *SecA*, *SecY* et la β-glucosidase reste à être confirmé.

#### 4) Caractérisation de l'expression des peptidases dans les mutants dérégulés.

La transcription des gènes de peptidases a été caractérisée dans les mutants par mesure d'activité. Deux classes de mutants peuvent être obtenues, l'une pour laquelle la transcription de plusieurs peptidases est déréprimée (mutants pléiotropes) et l'autre où seule la transcription du gène *pepO* est déréprimée.

Mutants des gènes *codY*, *dtpT* : dans un milieu riche M17 qui contient des peptides répresseurs, les activités luciférases ont été mesurées dans une souche sauvage et dans un mutant *codY* pour les promoteurs *PpepOD*, *PpepC* et *PpepN*, et dans un mutant *dtpT* pour le promoteur *PpepOD*. Dans un mutant *codY*, la répression de la transcription est diminuée d'un facteur 35, 4 et 14 respectivement pour les gènes *pepOD*, *pepC* et *pepN*. Dans un mutant *dtpT*, la répression de la transcription est diminuée d'un facteur 15 pour le gène *pepOD*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) BOUTROU R., SEPULCHRE A., GRIPON J.C.,  
MONNET V., 1998. Simple test for predicting the lytic  
5 behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in  
cheese. *J. Dairy Sci.*, 81,2321-2328.

2) DELORME C., EHRLICH S.D., RENAULT P., 1999.  
Regulation of expression of the *Lactococcus lactis*  
histidine operon. *J. Bacteriol.*, 181, 2026-2037.

10 3) Driessen A., Fekkes P., van der Wolk JP,  
"The Sec system" 1998, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(2), 216-  
222.

4) DROUAULT S., CORTHER G., DELORME C.,  
EHRLICH S.D., RENAULT P., 1998. Régulations métaboliques  
15 de *Lactococcus lactis* en culture pure ou mixte dans le  
lait. *Lait*, 77, 15-23.

5) GASSON M. J., SWINDELL S., MAEDA S., DODD  
H.M., 1992. Molecular rearrangement of lactose plasmid DNA  
associated with high-frequency transfer and cell  
20 aggregation in *Lactococcus lactis* 712. *Mol. Microbiol.*, 6,  
3213-3223.

6) GODON J. J., JURY K., SHEARMAN C. A., GASSON  
M. J., 1994. The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation  
gene *cluA*. *Mol. Microbiol.*, 12, 655-663.

25 7) GODON J. J., PILLIDGE C. J., JURY K.,  
GASSON, M. J., 1996. Caractérisation d'un élément  
conjugatif original, le facteur sexuel de *Lactococcus*  
*lactis* 712. *Lait*, 76, 41-50.

8) Guédon E., Renault P., Ehrlich SD., Delorme  
30 C. "Environmental factors involved in the transcriptional  
regulation of 18 proteolysis components in *Lactococci*"  
soumis pour publication).

9) E. Guédon, P. Renault, SD Ehrlich et  
C.Delorme "Evaluation de la diversité de l'expression  
35 génétique chez les lactocoques : développement d'un outil



et son application aux peptidases", accepté pour publication dans Science des aliments).

10) Hagting A. et al., 1994, "The di- and tri-peptide transport protein of *Lactococcus lactis*", J. Biol. Chem., 269, 11391-11399.

11) HILL P. J., REES C. E. D., WINSON M. K., STEWART, G. S. A. B., 1993. The application of lux genes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 3-14.

12) JUILLARD V., LE BARS D., KUNJI E. R., KONINGS W. N., GRIPON J. C., RICHARD, J., 1995 . Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3024-3030.

13) Koivula T., Palva I., Hemila H., "Nucleotide sequence of the secY gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four secY proteins" 1991, FEBS Lett. 288: 114-8.

14) KUNJI E. R., MIERAU I., HAGTING A., POOLMAN B., KONINGS, W. N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.

15) LAW J., BUIST G., HAANDRIKMAN A., KOK J., VENEMA G., LEENHOUTS K., 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.*, 177, 7011-7018.

16) Maguin E., Prevost , Ehrlich SD, Gruss A., "Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria", 1996, J. Bact. 178, 931-935.

17) Martin-Verstraete I., Debarbouillé M., Klier A., Rapoport G. "Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon" 1990, J. Mol. Biol., 244, 657-671.

18) MARUGG J. D., MEIJER W., VAN KRANENBURG R.,  
LAVERMAN P., BRUINENBERG P. G., DE VOS W. M., 1995. Medium-  
dependent regulation of proteinase gene expression in  
*Lactococcus lactis*, control of transcription initiation by  
specific dipeptides. *J. Bacteriol.*, 177, 2982-2989.

19) MEIJER W., MARUGG J. D., HUGENHOLTZ J.,  
1996. Regulation of proteolytic enzyme activity in  
*Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 156-161.

20) RENAULT P., CORTIER G., GOUPIL N., DELORME  
C., EHRLICH S.D., 1996. Plasmid vectors for gram-positive  
bacteria switching from high to low copy number. *Gene*. 183,  
175-182.

21) PREVOST H., EHRLICH S.D., GRUSS A., 1996,  
Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other  
gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 178 : 931-935.

22) SISSLER M., DELORME C., BOND J., EHRLICH  
SD, RENAULT P., FRANCKLYN C., 1999, "An aminoacyl-tRNA  
synthetase paralog with a catalytic role in histidine  
biosynthesis" *PNAS*, 96:8985-8990.

## REVENDICATIONS

5 1) Mutant de bactérie lactique capable de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisé en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de  
10 l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase.

15 2) Mutant de bactérie lactique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite inactivation est totale ou partielle.

20 3) Mutant de bactérie lactique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence d'ADN de l'un desdits gènes ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifiée.

25 4) Mutant de bactérie lactique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un desdits gènes et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur est modifié.

30 5) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la bactérie lactique est *L. lactis*.

35 6) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la bactérie lactique est *S. thermophilus*.

7) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène *codY* est inactivé.

5

8) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'ADN du gène *codY* ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifiée.

10

9) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité du gène *codY* et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

15

10) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un des gènes de l'opéron *lev* est inactivé.

20

11) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'ADN de l'un des gènes de l'opéron *lev* ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de l'un des gènes de cet opéron est modifiée.

25

12) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un des gènes de l'opéron *lev* et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

30

35

13) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase est inactivé.

5

14) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine homologue à une  $\beta$ -glucosidase ou une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifié.

10

15) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité d'un gène codant pour une protéine codant pour une  $\beta$ -glucosidase et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

15

16) Vecteur recombinant pour identifier ou sélectionner les bactéries lactiques mutantes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène marqueur fusionné à un gène de peptidase ou un promoteur de de gène, une origine de répllication inactivée après intégration dans la bactérie, un marqueur antibiotique, et une partie du gène *cluA*.

20

25

17) Méthode d'identification ou de sélection d'une bactérie lactique mutante selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'on transfère un gène de peptidase ou un promoteur de ce gène dans une bactérie par conjugaison avec le vecteur selon la revendication 16, puis l'on cultive ladite bactérie en présence de peptides et l'on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur.

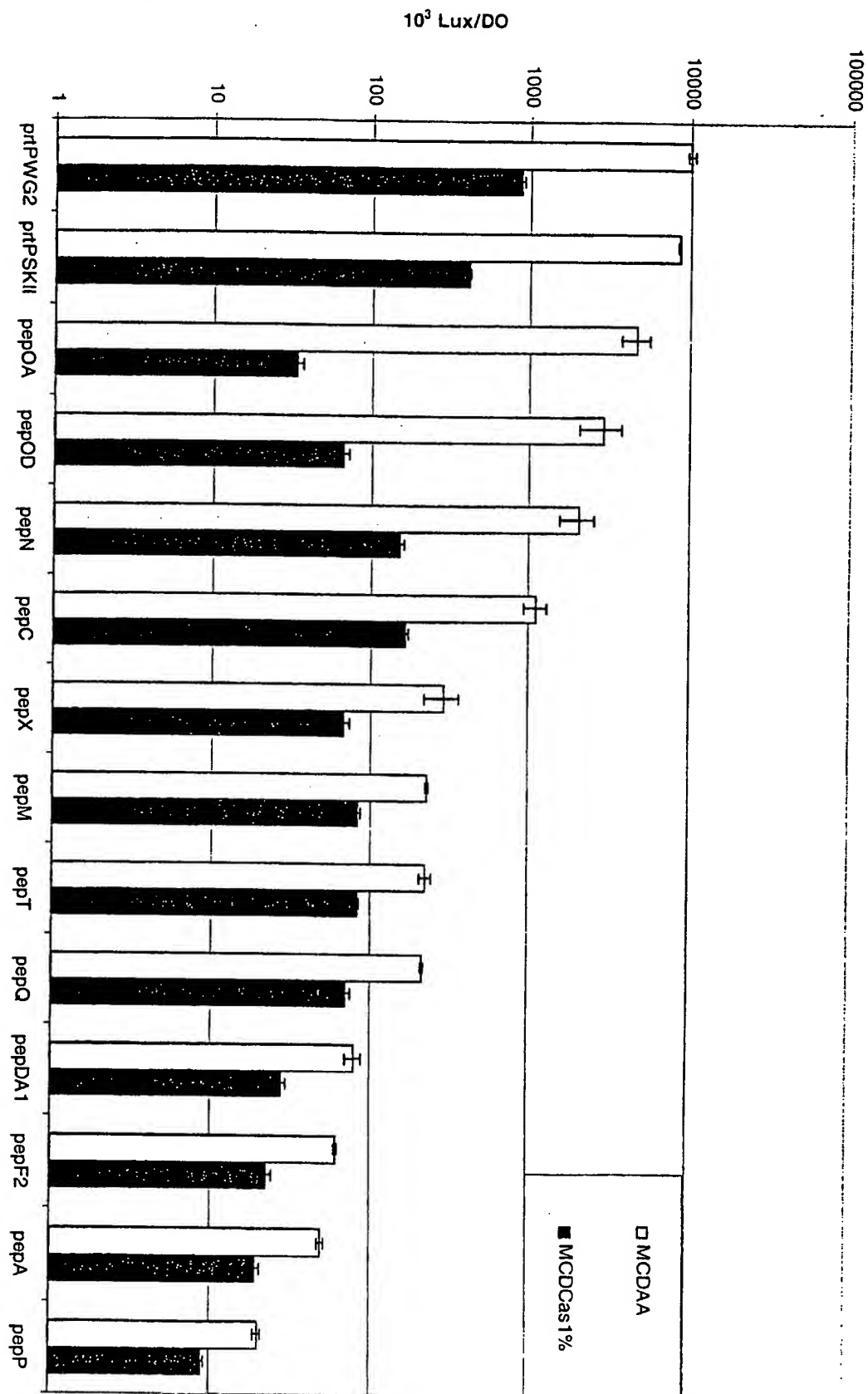
30

35

18) Utilisation des mutants de bactéries lactiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, ou un mélange de ceux-ci dans un procédé de fabrication et/ou de maturation du fromage.

1/4

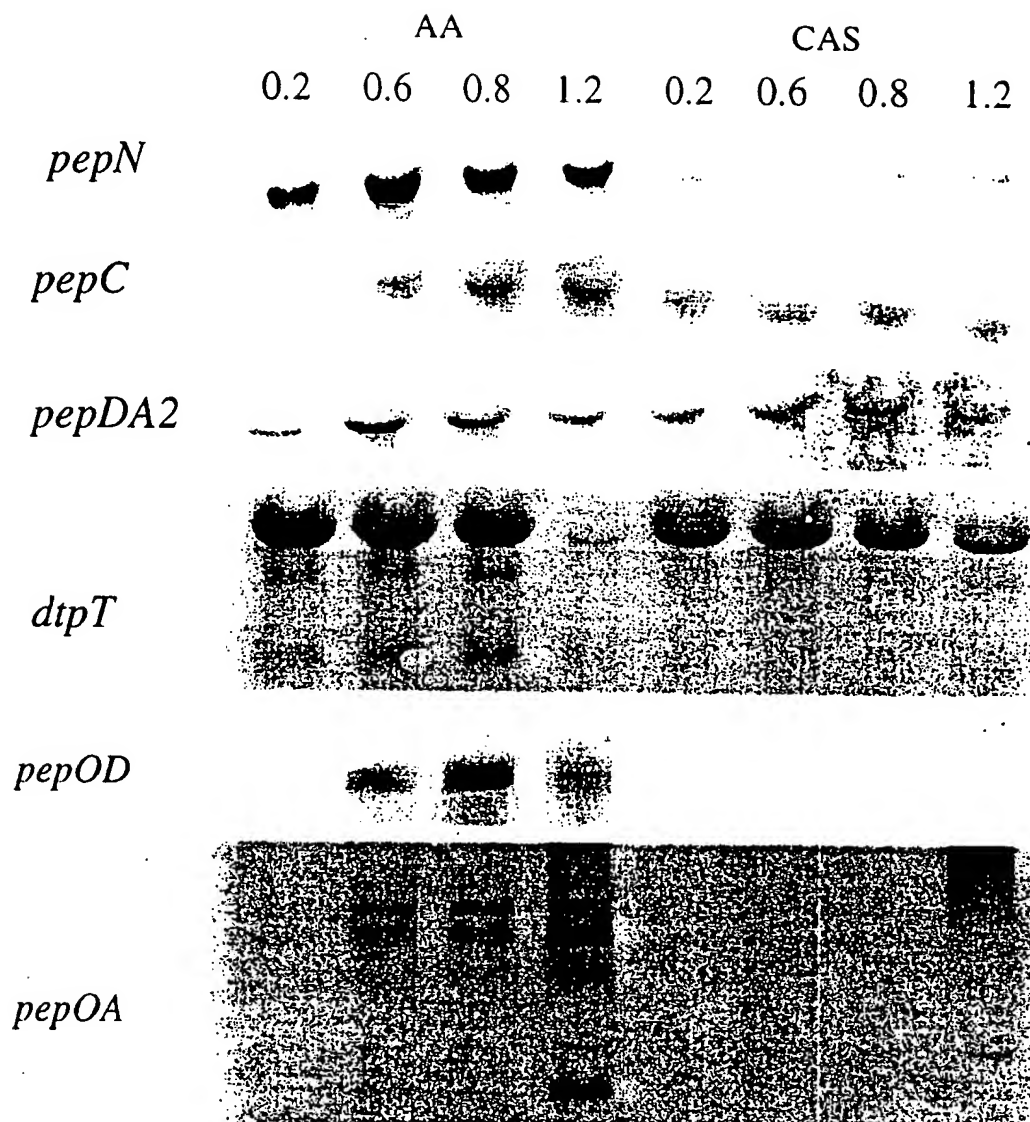
Fig. 1



2/4

Fig. 2

## A/ Promoteurs régulés



## B/ Promoteurs non régulés

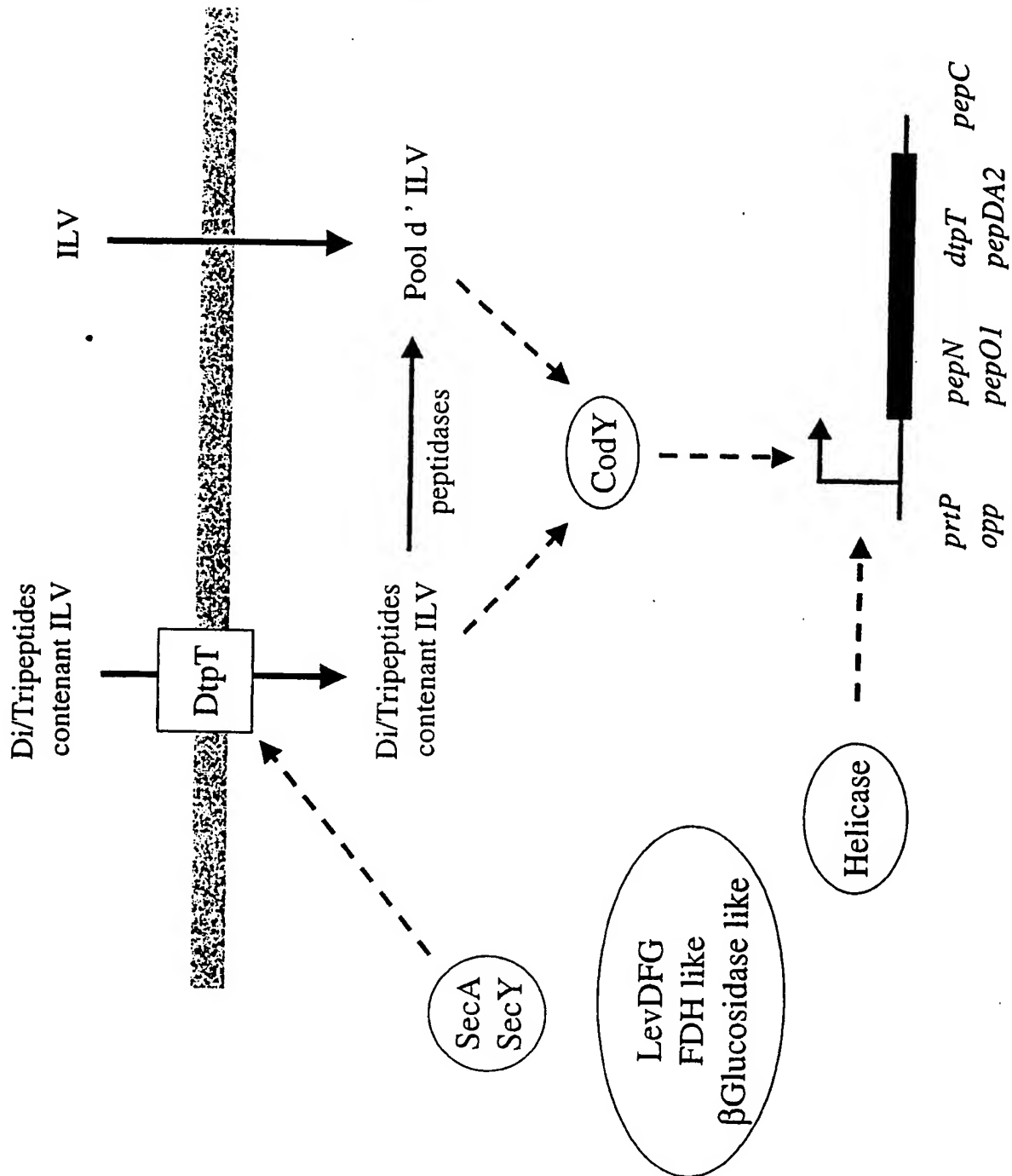


BEST AVAILABLE COPY



3/4

Fig. 3



4/4

Fig. 4

	1					50
codyMG	~LLEKTRKIT	AILQDGVTDL	QQLPYNSMT	ERLANVIDCN	ACVINTKGEL	
codybac	ALLQKTRIIN	SMLQAAA...	GKPVNFKEMA	ETLRDVIDSN	IFVVSRRGKL	
	51					100
codyMG	LGYSLPYNTN	NDRVDQFFYD	RKLPDEYVRA	AVRIYDTMAN	VPVDRPLAIF	
codybac	LGYSINQQIE	NDRMKKMLED	RQFPPEYTKN	LFNVPETSSN	LDINSEYTAF	
	101					150
codyMG	PEESLSDFPK	GVTTLAPIYG	SGMRLGTFIM	WREDGEFTDD	DLVLVELATT	
codybac	PVENRDLFQA	GLTTIVPIIG	GGERLGTLIL	SRLQDQFNDD	DLILAEGAT	
	151					200
codyMG	VIGVQLSNLK	LEQMEENIRK	DTMATMAVNT	LSYSEMKAVK	AIIEELDCEE	
codybac	VVGMEILREK	AEEIEEEARS	KAVVQMAISS	LSYSELEAIE	HIFEELDENE	
	201					250
codyMG	GHVIASVIAD	KIGITRSVIV	NALRKLESAG	VIESRSLGMK	GTYLKVLNTG	
codybac	GLLVASKIAD	RVGITRSVIV	NALRKLESAG	VIESRSLGMK	GTYIKVLNNK	
	251	261				
codyMG	LFDKLAGRNF	-				
codybac	FLIELENLKS	H				

codyMG, séquence protéique de CodY de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363  
 codybac, séquence protéique de CodY de *B. subtilis*

## LISTE DE SÉQUENCES

## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 1

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 1

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 1

AGAGTAATTT TTCTGACAAT TTTTATTGT TTTTCCATAT GCTTTTTTAT GTTATACTGA 60

TTATGAAAAA TTTTGTATAA AAACAAGAAT ATAAAAAAT AGGAGAACAA AGTGGCTACA 120

TTA CTT GAA AAA ACA CGT AAA ATC ACC GCG ATT TTG CAA GAT GGA GTG 168  
 Leu Leu Glu Lys Thr Arg Lys Ile Thr Ala Ile Leu Gln Asp Gly Val  
 1 5 10 15

ACC GAT TTG CAA CAA GAG TTG CCA TAC AAC AGT ATG ACT GAA CGC TTG 216  
 Thr Asp Leu Gln Gln Glu Leu Pro Tyr Asn Ser Met Thr Glu Arg Leu  
 20 25 30

GCA AAC GTC ATT GAT TGC AAC GCC TGC GTG ATT AAT ACG AAG GGC GAG 264  
 Ala Asn Val Ile Asp Cys Asn Ala Cys Val Ile Asn Thr Lys Gly Glu  
 35 40 45

TTG CTT GGT TAC TCA TTG CCT TAC AAT ACA AAC AAT GAT CGC GTT GAC 312  
 Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Pro Tyr Asn Thr Asn Asn Asp Arg Val Asp  
 50 55 60

CAA TTT TTC TAC GAT CGT AAA TTG CCT GAC GAA TAC GTT CGT GCA GCA 360  
 Gln Phe Phe Tyr Asp Arg Lys Leu Pro Asp Glu Tyr Val Arg Ala Ala  
 65 70 75 80

GTA CGT ATT TAC GAT ACA ATG GCA AAC GTT CCT GTT GAT CGT CCT TTA 408  
 Val Arg Ile Tyr Asp Thr Met Ala Asn Val Pro Val Asp Arg Pro Leu  
 85 90 95

GCA ATT TTC CCA GAA GAA AGT CTT AGC GAT TTT CCA AAA GGT GTA ACA 456  
 Ala Ile Phe Pro Glu Glu Ser Leu Ser Asp Phe Pro Lys Gly Val Thr  
 100 105 110

ACT TTA GCG CCT ATC TAT GGT TCT GGA ATG CGT CTT GGA ACA TTT ATT 504  
 Thr Leu Ala Pro Ile Tyr Gly Ser Gly Met Arg Leu Gly Thr Phe Ile  
 115 120 125

ATG TGG CGT GAA GAT GGT GAA TTT ACA GAT GAC GAT CTT GTT TTG GTT 552  
 Met Trp Arg Glu Asp Gly Glu Phe Thr Asp Asp Asp Leu Val Leu Val  
 130 135 140

GAG CTT GCA ACA ACA GTA ATC GGT GTA CAA CTC TCA AAC CTT AAA CTT 600  
 Glu Leu Ala Thr Thr Val Ile Gly Val Gln Leu Ser Asn Leu Lys Leu  
 145 150 155 160

GAA CAA ATG GAA GAA AAT ATC CGT AAA GAC ACT ATG GCA ACA ATG GCT 648  
 Glu Gln Met Glu Glu Asn Ile Arg Lys Asp Thr Met Ala Thr Met Ala  
 165 170 175

GTT AAT ACA CTT TCT TAC TCA GAA ATG AAA GCT GTC AAA GCA ATT ATT	696
Val Asn Thr Leu Ser Tyr Ser Glu Met Lys Ala Val Lys Ala Ile Ile	
180 185 190	
GAA GAA CTT GAT GGT GAA GAA GGG CAT GTT ATT GCC TCT GTC ATT GCT	744
Glu Glu Leu Asp Gly Glu Glu Gly His Val Ile Ala Ser Val Ile Ala	
195 200 205	
GAC AAG ATT GGT ATT ACA CGT TCA GTG ATT GTT AAT GCT TTA CGT AAA	792
Asp Lys Ile Gly Ile Thr Arg Ser Val Ile Val Asn Ala Leu Arg Lys	
210 215 220	
CTT GAA TCT GCT GGT GTT ATT GAA TCA CGT TCA CTT GGT ATG AAA GGA	840
Leu Glu Ser Ala Gly Val Ile Glu Ser Arg Ser Leu Gly Met Lys Gly	
225 230 235 240	
ACT TAT CTT AAA GTT CTT AAT ACT GGT TTG TTT GAT AAA CTT GCT GGA	888
Thr Tyr Leu Lys Val Leu Asn Thr Gly Leu Phe Asp Lys Leu Ala Gly	
245 250 255	
CGT AAT TTC TAAAAGTCAG AGCTTAACGC TTGTTCTTTT ATCATTTGTT	937
Arg Asn Phe	
259	

## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 2

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 2

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 2

Met Arg Ala Ile Leu Val Tyr Tyr Leu Tyr Ala Leu Thr Thr Ala Asp	
1 5 10 15	
AAC GCA GGT TTA GGA CTT CCT AAA GCT CAG GCA ATG GCG ATT GTA AGT	96
Asn Ala Gly Leu Gly Leu Pro Lys Ala Gln Ala Met Ala Ile Val Ser	
20 25 30	
ATT TAT GGT GCA CTT GTC TAT CTT TCA ACA ATT GTT GGG GGA TGG GTT	144
Ile Tyr Gly Ala Leu Val Tyr Leu Ser Thr Ile Val Gly Gly Trp Val	
35 40 45	
GCT GAC CGG TTG TTG GGC GCT TCG CGC ACA ATC TTC TTG GGT GGT ATT	192
Ala Asp Arg Leu Leu Gly Ala Ser Arg Thr Ile Phe Leu Gly Gly Ile	
50 55 60	
TTA ATC ACT TTA GGA CAC GTC GCT TTA GCA ACA CCA TTT GGT TTA TCT	240
Leu Ile Thr Leu Gly His Val Ala Leu Ala Thr Pro Phe Gly Leu Ser	
65 70 75 80	
TCA CTC TTC GTG GCA TTA TTC TTG ATT ATC TTA GGA ACA GGG ATG CTT	288
Ser Leu Phe Val Ala Leu Phe Leu Ile Ile Leu Gly Thr Gly Met Leu	
85 90 95	
AAA CCC AAT ATT TCT AAC ATG GTT GGG CAT CTA TAT TCA AAA GAT GAC	336
Lys Pro Asn Ile Ser Asn Met Val Gly His Leu Tyr Ser Lys Asp Asp	
100 105 110	

TCA CGT CGT GAT ACT GGA TTT AAT ATC TTT GTA GTC GGA ATT AAT ATG	384
Ser Arg Arg Asp Thr Gly Phe Asn Ile Phe Val Val Gly Ile Asn Met	
115 120 125	
GGT TCT CTG ATT GCT CCA TTG ATT GTT GGG ACA GTT GGA CAA GGC GTG	432
Gly Ser Leu Ile Ala Pro Leu Ile Val Gly Thr Val Gly Gln Gly Val	
130 135 140	
AAC TAC CAC TTA GGT TTC TCA CTT GCC GCA ATC GGA ATG ATT TTT GCA	480
Asn Tyr His Leu Gly Phe Ser Leu Ala Ala Ile Gly Met Ile Phe Ala	
145 150 155 160	
TTA TTT GCT TAT TGG TAT GGA CGT CTT CGT CAT TTC CCA GAA ATT GGA	528
Leu Phe Ala Tyr Trp Tyr Gly Arg Leu Arg His Phe Pro Glu Ile Gly	
165 170 175	
CGT GAA CCA TCT AAT CCA ATG GAT GCA AAA GCA AAA CGT AAT TTT ATT	576
Arg Glu Pro Ser Asn Pro Met Asp Ala Lys Ala Lys Arg Asn Phe Ile	
180 185 190	
ATT ACA TTA ACG ATT GTT CTT ATC GTT GCT TTA ATC GGA TTT TTC TTA	624
Ile Thr Leu Thr Ile Val Leu Ile Val Ala Leu Ile Gly Phe Phe Leu	
195 200 205	
ATT TAT CAA GCA AGT CCT GCG AAT TTC ATC AAT AAT TTC ATT AAC GTT	672
Ile Tyr Gln Ala Ser Pro Ala Asn Phe Ile Asn Asn Phe Ile Asn Val	
210 215 220	
TTA TCA ATT ATC GGT ATT GTT GTT CCA ATT ATT TAT TTC GTA ATG ATG	720
Leu Ser Ile Ile Gly Ile Val Val Pro Ile Ile Tyr Phe Val Met Met	
225 230 235 240	
TTT ACC TCT AAA AAG GTA GAA TCA GAC GAA CGT CGT AAA TTA ACG GCT	768
Phe Thr Ser Lys Lys Val Glu Ser Asp Glu Arg Arg Lys Leu Thr Ala	
245 250 255	
TAT ATT CCT TTG TTC CTT TCT GCT ATT GTC TTT TGG GCA ATT GAA GAA	816
Tyr Ile Pro Leu Phe Leu Ser Ala Ile Val Phe Trp Ala Ile Glu Glu	
260 265 270	
CAA AGT TCT ACG ATT ATT GCG GTT TGG GGA GAA TCA CGT TCT AAC TTA	864
Gln Ser Ser Thr Ile Ile Ala Val Trp Gly Glu Ser Arg Ser Asn Leu	
275 280 285	
AAT CCT ACT TGG TTT GGA TTT ACT TTC CAT ATT GAC CCA TCT TGG TAC	912
Asn Pro Thr Trp Phe Gly Phe Thr Phe His Ile Asp Pro Ser Trp Tyr	
290 295 300	
CAA TTG TTG AAC CCA CTC TTC ATC GTT CTC TTG TCA CCT ATC TTT GTA	960
Gln Leu Leu Asn Pro Leu Phe Ile Val Leu Leu Ser Pro Ile Phe Val	
305 310 315 320	
CGA ATT TGG AAC AAA TTA GGA GAT CGT CAA CCA TCA ACC ATC GTT AAA	1008
Arg Ile Trp Asn Lys Leu Gly Asp Arg Gln Pro Ser Thr Ile Val Lys	
325 330 335	
TTT GGT CTT GGA CTG ATG TTG ACC GGA GCT TCT TAT TTG ATT ATG ACA	1056
Phe Gly Leu Gly Leu Met Leu Thr Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Met Thr	
340 345 350	
CTT CCT GGA CTC TTG AAT GGG ACT TCT GGA CGT GCG AGT GCT CTT TGG	1104
Leu Pro Gly Leu Leu Asn Gly Thr Ser Gly Arg Ala Ser Ala Leu Trp	
355 360 365	

CTA GTA TTG ATG TTT GCT GTT CAA ATG GCA GGT GAA TTA CTT GTT TCA Leu Val Leu Met Phe Ala Val Gln Met Ala Gly Glu Leu Leu Val Ser 370 375 380	1152
CCA GTT GGT TTA TCA GTT TCA ACA AAA TTA GCG CCA GTA GCA TTC CAA Pro Val Gly Leu Ser Val Ser Thr Lys Leu Ala Pro Val Ala Phe Gln 385 390 395 400	1200
TCT CAA ATG ATG GCA ATG TGG TTC TTG GCA GAC TCA ACT TCA CAA GCG Ser Gln Met Met Ala Met Trp Phe Leu Ala Asp Ser Thr Ser Gln Ala 405 410 415	1248
ATT AAT GCC CAA ATT ACA CCT ATC TTT AAA GCA GCA ACA GAA GTT CAC Ile Asn Ala Gln Ile Thr Pro Ile Phe Lys Ala Ala Thr Glu Val His 420 425 430	1296
TTC TTT GCA ATT ACA GGG ATT ATC GGT ATT ATC GTT GGA ATC ATC CTC Phe Phe Ala Ile Thr Gly Ile Ile Gly Ile Ile Val Gly Ile Ile Leu 435 440 445	1344
CTT ATT ATC AAA AAA CCT ATT TTG AAA TTA ATG GGA GAT GTT CGT Leu Ile Ile Lys Lys Pro Ile Leu Lys Leu Met Gly Asp Val Arg 450 455 460	1389

## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 3

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 3

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 3

ATG GAA AAT GTT GCC TTA ACT CAC TTT GTA GAT AAT GCT TTA CGT GCC Met Glu Asn Val Ala Leu Thr His Phe Val Asp Asn Ala Leu Arg Ala 1 5 10 15	48
AAC TTT ATC ATG CTT CAC GAC ATC GAC TAT ATG GTT GAT GAA AAC CAA Asn Phe Ile Met Leu His Asp Ile Asp Tyr Met Val Asp Glu Asn Gln 20 25 30	96
GAA GTT TTG ATT ATT GAC CAA TTT ACT GGA CGT ACG ATG CCT GGA CGT Glu Val Leu Ile Ile Asp Gln Phe Thr Gly Arg Thr Met Pro Gly Arg 35 40 45	144
CGC TAT TCT GAT GGT CTT CAC CAA GCA ATT GAA GCT AAA GAA GCT GTG Arg Tyr Ser Asp Gly Leu His Gln Ala Ile Glu Ala Lys Glu Ala Val 50 55 60	192
CCA ATT CAA GAT GAA TCA AAA ACA ATG GCT TCA ATT ACG ATT CAA AAC Pro Ile Gln Asp Glu Ser Lys Thr Met Ala Ser Ile Thr Ile Gln Asn 65 70 75 80	240
TAC TTC CGG ATG TAT AAA AAA CTG TCA GGG ATG ACA GGG ACT GCT AAA Tyr Phe Arg Met Tyr Lys Lys Leu Ser Gly Met Thr Gly Thr Ala Lys 85 90 95	288
ACC GAA GAA GAA GAA TTC CGT GAG ATT TAT AAC ATT CAA ATC ACA CCA Thr Glu Glu Glu Glu Phe Arg Glu Ile Tyr Asn Ile Gln Ile Thr Pro 100 105 110 115 120	336

100	105	110	
ATT CCA ACC AAC CGT CCT GTT CAA CGT TTA GAT CAT CCA GAT TTA CTT Ile Pro Thr Asn Arg Pro Val Gln Arg Leu Asp His Pro Asp Leu Leu 115 120 125			384
TAC CCA ACT TTG GAA GCT AAA TTT AAA GCA GTT ATT GAT GAT ATT AAA Tyr Pro Thr Leu Glu Ala Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Asp Ile Lys 130 135 140			432
CGT CGT CAT GCT GAA GGT CAA CCA ATA TTG ATT GGT ACT GTT GCT GTC Arg Arg His Ala Glu Gly Gln Pro Ile Leu Ile Gly Thr Val Ala Val 145 150 155 160			480
GAA ACT TCC GAA TTG ATT TCT AAG AAA TTG GTT GAA GCA AAA ATT CCT Glu Thr Ser Glu Leu Ile Ser Lys Lys Leu Val Glu Ala Lys Ile Pro 165 170 175			528
CAC GAA GTT TTG AAT GCG AAA AAT CAC TTC CGT GAA GCA CAA ATC ATC His Glu Val Leu Asn Ala Lys Asn His Phe Arg Glu Ala Gln Ile Ile 180 185 190			576
ATG AAT GCG GGT CAA CAA GGA GCA GTA ACG ATT GCG ACC AAC ATG GCC Met Asn Ala Gly Gln Gln Gly Ala Val Thr Ile Ala Thr Asn Met Ala 195 200 205			624
GGT CGT GGG ACT GAT ATC AAG CTT GGG CCT GGT GTA ATT GAT CAT GTA Gly Arg Gly Thr Asp Ile Lys Leu Gly Pro Gly Val Ile Asp His Val 210 215 220			672
GAC CCT GAA TTC CGA GGT CTT GCT GTT ATT GGT ACT GAG CGT CAT GAA Asp Pro Glu Phe Arg Gly Leu Ala Val Ile Gly Thr Glu Arg His Glu 225 230 235 240			720
TCT CGT CGT ATT GAT AAT CAA TTA CGT GGT CGT TCT GGA CGT CAA GGT Ser Arg Arg Ile Asp Asn Gln Leu Arg Gly Arg Ser Gly Arg Gln Gly 245 250 255			768
GAC CCA GGG GTT TCA CAA TTC TAT CTT TCT CTT GAA GAT GAA TTA ATG Asp Pro Gly Val Ser Gln Phe Tyr Leu Ser Leu Glu Asp Glu Leu Met 260 265 270			816
AAA CGT TTT GGT TCG GAA CGT GTT TCA GCT TTC CTA GAT AGA ATG CGT Lys Arg Phe Gly Ser Glu Arg Val Ser Ala Phe Leu Asp Arg Met Arg 275 280 285			864
ATT TCT GGT GAA GAT GCT GTC ATC AAA TCT GGC TTG ATT ACT CGT CAG Ile Ser Gly Glu Asp Ala Val Ile Lys Ser Gly Leu Ile Thr Arg Gln 290 295 300			912
ATT GAA AGT TCA CAA AAA CGT GTC GAA GGA AAT AAC TAC GAT TCT CGT Ile Glu Ser Ser Gln Lys Arg Val Glu Gly Asn Asn Tyr Asp Ser Arg 305 310 315 320			960
AAA CAA GTC TTG CAA TAT GAT GAT GTC ATC CGT GAG CAA CGT GAA GTT Lys Gln Val Leu Gln Tyr Asp Asp Val Ile Arg Glu Gln Arg Glu Val 325 330 335			1008
ATT TAT GCG CAA CGT CAG GAA GTT ATC TTG GCT ACA GAA GAT ATG ACT Ile Tyr Ala Gln Arg Gln Glu Val Ile Leu Ala Thr Glu Asp Met Thr 340 345 350			1056
CCT GTT TTG ATG GGC ATG TTC AAG CGA ACA ATT GAT CGT CAA GTG GAT			1104

Pro Val Leu Met Gly Met Phe Lys Arg Thr Ile Asp Arg Gln Val Asp	
355	360
365	
GGT CAT GAA CTT GCA GGA AGT CTT AAA GAT GAA GAA AAT GTC AAA AAT	1152
Gly His Glu Leu Ala Gly Ser Leu Lys Asp Glu Glu Asn Val Lys Asn	
370	375
380	
CTC TTG CAA ACA TTA CAC AAT ACA ATG TTG CCA GAA GAT GGC ATT GAA	1200
Leu Leu Gln Thr Leu His Asn Thr Met Leu Pro Glu Asp Gly Ile Glu	
385	390
395	400
TTG TCT GAA CTG ACA GGT TTG TCA GTA CAA GCA ATG AAA GAT TTG ATT	1248
Leu Ser Glu Leu Thr Gly Leu Ser Val Gln Ala Met Lys Asp Leu Ile	
405	410
415	
TTT GAT AAA GTC AAA GCT CGT TAT GCT TCA CAA ATG GAA AAA TTA TCT	1296
Phe Asp Lys Val Lys Ala Arg Tyr Ala Ser Gln Met Glu Lys Leu Ser	
420	425
430	
GAC CCA GAA CGT CAG TTG GAA TTC CAA CGT GCA GTT ATC TTA CGA GTT	1344
Asp Pro Glu Arg Gln Leu Glu Phe Gln Arg Ala Val Ile Leu Arg Val	
435	440
445	
GTT GAT AAT AAC TGG TCA GAA CAC ATT GAT GCG CTT GAC CAA ATG CGT	1392
Val Asp Asn Asn Trp Ser Glu His Ile Asp Ala Leu Asp Gln Met Arg	
450	455
460	
CAA TCA GTA GGA CTT CGT GGT TAT GCC CAA AAT AAC CCT ATT GTT GAA	1440
Gln Ser Val Gly Leu Arg Gly Tyr Ala Gln Asn Asn Pro Ile Val Glu	
465	470
475	480
TAT CAA GAA GAA TCA TAT AAA ATG TAC AAT AAT ATG ATT GGT GCG ATT	1488
Tyr Gln Glu Glu Ser Tyr Lys Met Tyr Asn Asn Met Ile Gly Ala Ile	
485	490
495	
GAA TTT GAA GTG ACT CGT TTG ATG ATG AAA GCT CAA ATT CAA CCA CAA	1536
Glu Phe Glu Val Thr Arg Leu Met Met Lys Ala Gln Ile Gln Pro Gln	
500	505
510	
ACG GCA ATC CGT CAG GAA GCG CCA AGA ATG ACA ACC ACA GCT TCA CAA	1584
Thr Ala Ile Arg Gln Glu Ala Pro Arg Met Thr Thr Thr Ala Ser Gln	
515	520
525	
GAA AAT ATT ACA AAT GTT GAT ACT GAA CAT TCT GTC AGT GAA GAA ATT	1632
Glu Asn Ile Thr Asn Val Asp Thr Glu His Ser Val Ser Glu Glu Ile	
530	535
540	
TCA TTT GAA AAT GTT GGT CGT AAC GAC CTT TGT CCT TGT GGT TCT GGT	1680
Ser Phe Glu Asn Val Gly Arg Asn Asp Leu Cys Pro Cys Gly Ser Gly	
545	550
555	560
AAG AAG TTT AAA AAT TGT CAC GGA CGT ACA CAT ATT GCC	1719
Lys Lys Phe Lys Asn Cys His Gly Arg Thr His Ile Ala	
565	570
573	



## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 4

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 4

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 4

ATG TTT TTT AAG ACG CTT AAG GAA GCC TTT AAG GTC AAA GAC GTC CGA	48
Met Phe Phe Lys Thr Leu Lys Glu Ala Phe Lys Val Lys Asp Val Arg	
1 5 10 15	
GCA AGA ATT CTC TTT ACG ATT TTC ATC CTT TTT GTT TTC CGC TTA GGT	96
Ala Arg Ile Leu Phe Thr Ile Phe Ile Leu Phe Val Phe Arg Leu Gly	
20 25 30	
GCT CAT ATT ACG GTA CCT GGC GTC AAC GTT CAA AAC TTA ACA GAA GTA	144
Ala His Ile Thr Val Pro Gly Val Asn Val Gln Asn Leu Thr Glu Val	
35 40 45	
AGT AAT CTT CCT TTC TTG AAC ATG ATG AAC TTG GTT TCT GGT AAT GCC	192
Ser Asn Leu Pro Phe Leu Asn Met Met Asn Leu Val Ser Gly Asn Ala	
50 55 60	
ATG CAA AAC TAC TCA CTC TTT GCA ATG GGA GTT TCG CCT TAT ATC ACT	240
Met Gln Asn Tyr Ser Leu Phe Ala Met Gly Val Ser Pro Tyr Ile Thr	
65 70 75 80	
GCT TCA ATC ATT GTT CAA TTG TTG CAA ATG GAT ATT TTA CCA AAA TTT	288
Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Gln Met Asp Ile Leu Pro Lys Phe	
85 90 95	
GTT GAG TGG TCA AAA CAA GGG GAA ATT GGA CGT CGT AAA CTG AAT CAA	336
Val Glu Trp Ser Lys Gln Gly Glu Ile Gly Arg Arg Lys Leu Asn Gln	
100 105 110	
GCG ACA CGT TAC ATT ACC TTA GTG CTT GCT ATG GCA CAA TCT ATC GGG	384
Ala Thr Arg Tyr Ile Thr Leu Val Leu Ala Met Ala Gln Ser Ile Gly	
115 120 125	
ATT ACT GCT GGT TTC CAA GCC ATG AGC TCG TTA AAT ATT GTG CAA AAT	432
Ile Thr Ala Gly Phe Gln Ala Met Ser Ser Leu Asn Ile Val Gln Asn	
130 135 140	
CCA AAT TGG CAA AGC TAT TTG ATG ATT GGT GCA ATT TTG ACC ACT GGT	480
Pro Asn Trp Gln Ser Tyr Leu Met Ile Gly Ala Ile Leu Thr Thr Gly	
145 150 155 160	
TCA ATG GTT GTC ACT TGG ATG GGT GAA CAA ATT AAT GAC CAA GGT TTT	528
Ser Met Val Val Thr Trp Met Gly Glu Gln Ile Asn Asp Gln Gly Phe	
165 170 175	
GGC TCA GGT GTT TCA GTA ATC ATC TTT GCT GGG ATT GTC TCT AGT ATT	576
Gly Ser Gly Val Ser Val Ile Ile Phe Ala Gly Ile Val Ser Ser Ile	
180 185 190	
CCA TCA GCC ATC AAA TCT GTT TAT GAT GAA AAA TTC TTA AAC GTA AGA	624
Pro Ser Ala Ile Lys Ser Val Tyr Asp Glu Lys Phe Leu Asn Val Arg	
195 200 205	

CCA TCT GAA ATT CCT ATG TCT TGG ATA TTT GTT ATT GGA TTG ATT TTG Pro Ser Glu Ile Pro Met Ser Trp Ile Phe Val Ile Gly Leu Ile Leu 210 215 220	672
TCA GCA ATT GTC ATT ATT TAT GTT ACA ACA TTT GTT CAA CAA GCG GAA Ser Ala Ile Val Ile Ile Tyr Val Thr Thr Phe Val Gln Gln Ala Glu 225 230 235 240	720
CGT AAA GTA CCA ATT CAA TAC ACT AAG TTG ACT CAA GGC GCA CCA ACA Arg Lys Val Pro Ile Gln Tyr Thr Lys Leu Thr Gln Gly Ala Pro Thr 245 250 255	768
AGT TCG TAC TTT CCA CTT CGT GTC AAT CCA GCT GGT GTT ATC CCA GTT Ser Ser Tyr Phe Pro Leu Arg Val Asn Pro Ala Gly Val Ile Pro Val 260 265 270	816
ATC TTT GCT GGT TCA ATT ACA ACT GCT CCT GCT ACG ATC TTG CAA TTC Ile Phe Ala Gly Ser Ile Thr Thr Ala Pro Ala Thr Ile Leu Gln Phe 275 280 285	864
TTG CAA CGT TCA CAA GGT AGC AAT GTA GGT TGG TTA TCA ACC TTA CAA Leu Gln Arg Ser Gln Gly Ser Asn Val Gly Trp Leu Ser Thr Leu Gln 290 295 300	912
AAC GCC TTG TCA TAT ACG ACT TGG ACA GGA ATG CTC TTC TAC GCA TTA Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Thr Trp Thr Gly Met Leu Phe Tyr Ala Leu 305 310 315 320	960
TTG ATT GTT CTC TTT ACT TTC TTC TAC TCA TTC GTT CAG GTC AAT CCT Leu Ile Val Leu Phe Thr Phe Phe Tyr Ser Phe Val Gln Val Asn Pro 325 330 335	1008
GAA AAG ATG GCT GAA AAC CTT CAA AAA CAA GGC TCT TAC ATT CCA TCT Glu Lys Met Ala Glu Asn Leu Gln Lys Gln Gly Ser Tyr Ile Pro Ser 340 345 350	1056
GTT CGT CCG GGT AAA GGA ACC GAA AAG TAT GTT TCT CGT CTC TTA ATG Val Arg Pro Gly Lys Gly Thr Glu Lys Tyr Val Ser Arg Leu Leu Met 355 360 365	1104
CGT CTT GCA ACG GTT GGT TCG CTC TTC CTT GGA TTG ATT TCA ATC ATT Arg Leu Ala Thr Val Gly Ser Leu Phe Leu Gly Leu Ile Ser Ile Ile 370 375 380	1152
CCA ATT GCG GCC CAA AAC GTT TGG GGA CTT CCA AAA ATC GTC GCT CTT Pro Ile Ala Ala Gln Asn Val Trp Gly Leu Pro Lys Ile Val Ala Leu 385 390 395 400	1200
GGA GGG ACA TCA TTA TTA ATC TTG ATT CAA GTT GCG ATT CAA GCA GTT Gly Gly Thr Ser Leu Leu Ile Leu Ile Gln Val Ala Ile Gln Ala Val 405 410 415	1248
AAA CAA CTT GAA GGA TAT TTA CTT AAA CGT AAA TAT GCA GGA TTT ATG Lys Gln Leu Glu Gly Tyr Leu Leu Lys Arg Lys Tyr Ala Gly Phe Met 420 425 430	1296
GAT AAT CCA CTT GAA ACA AAA Asp Asn Pro Leu Glu Thr Lys 435 439	1317

## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:5

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:5

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:5

GTAATATTTT TATGAAAACA TTTGCAAATA TCGATTGAA GTAGTATAAT AACTAAGTAA 60

TAATTTTAT TATAATCTTA TATAGGAGGT TACTCACATT GAGTATCGGA ATTGTTATTG 120

CGAGCC ATG GTG AAT TCG CCG CAG ATC AAA CAA TCT GGT TCT ATG ATT 168  
Met Val Asn Ser Pro Gln Ile Lys Gln Ser Gly Ser Met Ile  
1 5 10

TTC GGA GAG CAA GAA AAA GTA CAA GTT GTT ACT TTT ATG CCT AGC GAA 216  
Phe Gly Glu Gln Glu Lys Val Gln Val Val Thr Phe Met Pro Ser Glu  
15 20 25 30

GGA CCA ACT GAT TTG CAT GCT AAA ATC GAA GCT GCC ATC GCA ACA TTT 264  
Gly Pro Thr Asp Leu His Ala Lys Ile Glu Ala Ala Ile Ala Thr Phe  
35 40 45

GAT GCT GAA GAT GAA GTA CTT GTC CTT GCT GAC TTA TGG AGC GGT TCT 312  
Asp Ala Glu Asp Glu Val Leu Val Leu Ala Asp Leu Trp Ser Gly Ser  
50 55 60

CCA TTT AAT CAA GCA AGT GCA GTG ATG GGT GAA AAT CCA GAG CGC AAG 360  
Pro Phe Asn Gln Ala Ser Ala Val Met Gly Glu Asn Pro Glu Arg Lys  
65 70 75

ATT GCT ATC ATC ACA GGC CTC AAC CTG CCT ATG CTT ATC CAA GCC TAC 408  
Ile Ala Ile Ile Thr Gly Leu Asn Leu Pro Met Leu Ile Gln Ala Tyr  
80 85 90

ACA GAA CGC ATG ATG GAT GCG TCT GCC GGG GTG GAT AAA GTC GTA GCA 456  
Thr Glu Arg Met Met Asp Ala Ser Ala Gly Val Asp Lys Val Val Ala  
95 100 105 110

AAT ATT ATG AAA GAA GCC AAA GGC GGT ATT AAA GTA CTA CCT GAA GAA 504  
Asn Ile Met Lys Glu Ala Lys Gly Gly Ile Lys Val Leu Pro Glu Glu  
115 120 125

CTT CAA CCT GCT GAA GAA ACT GCT GTT GCA GCT GCT CCG GCT GCT GTT 552  
Leu Gln Pro Ala Glu Glu Thr Ala Val Ala Ala Pro Ala Ala Val  
130 135 140

CAA GGT GCG ATT CCT GAA GGA ACA GTC ATC GGT GAT GGT AAA ATT AAA 600  
Gln Gly Ala Ile Pro Glu Gly Thr Val Ile Gly Asp Gly Lys Ile Lys  
145 150 155

ATT AAC CTC GCT CGT ATT GAC TCA CGT TTG CTT CAC GGA CAA GTT GCA 648  
Ile Asn Leu Ala Arg Ile Asp Ser Arg Leu Leu His Gly Gln Val Ala  
160 165 170

ACT GCT TGG ACT CCA GAC TCA AGA GCA AAC CGC ATC ATC GTT GTT TCT 696  
Thr Ala Trp Thr Pro Asp Ser Arg Ala Asn Arg Ile Ile Val Val Ser  
175 180 185 190

GAC ACC GTT TCT AAA GAT GAA CTT CGT AAG AAG CTC ATT GAA CAA GCG Asp Thr Val Ser Lys Asp Glu Leu Arg Lys Lys Leu Ile Glu Gln Ala 195 200 205	744
GCT CCA ACT GGT GTA AAA GCT AAC GTT ATA CCA ATT AAG AAA ATG ATT Ala Pro Thr Gly Val Lys Ala Asn Val Ile Pro Ile Lys Lys Met Ile 210 215 220	792
GAA GTT GCT AAA GAC CCA CGT TTT GGT GAC ACT AAA GCC CTT CTT CTT Glu Val Ala Lys Asp Pro Arg Phe Gly Asp Thr Lys Ala Leu Leu Leu 225 230 235	840
TTC GAA ACG CCA CAA GAC GCT CTT GCA ACA ATC GAA GGT GGC GTA CCA Phe Glu Thr Pro Gln Asp Ala Leu Ala Thr Ile Glu Gly Gly Val Pro 240 245 250	888
ATT GAA ACA TTG AAC GTT GGT TCT ATG GCT CAC TCA ACT GGT AAA ACA Ile Glu Thr Leu Asn Val Gly Ser Met Ala His Ser Thr Gly Lys Thr 255 260 265 270	936
ATG CTC AAC AAA GTT CTT TCT ATG GAC AAA GAT GAC GTT GCT ACT TTT Met Leu Asn Lys Val Leu Ser Met Asp Lys Asp Asp Val Ala Thr Phe 275 280 285	984
GAA AAA TTG CGT GAC CTC GGA GTT AAA TTC GAC GTA CGT AAA GTT CCA Glu Lys Leu Arg Asp Leu Gly Val Lys Phe Asp Val Arg Lys Val Pro 290 295 300	1032
GCT GAC TCT AAA TCT GAC CTC TTT GGT TTG ATT AAC AAA GCT GAC GTA Ala Asp Ser Lys Ser Asp Leu Phe Gly Leu Ile Asn Lys Ala Asp Val 305 310 315	1080
CAA TAATCAGAAT ATGCTCGTAT GATATTCTGA TTACTAAAAT TGAATATTAG Gln	1133
GCAGCCAAAT AATTAAGGAG ATATAAAAAA C ATG GAA TAC GGT GTT TTA TCT Met Glu Tyr Gly Val Leu Ser 320 325	1185
GTA ATC TTG GTC ATT GTT GTT GCC TTC CTT GCT GGT CTT GAA GGT ATC Val Ile Leu Val Ile Val Val Ala Phe Leu Ala Gly Leu Glu Gly Ile 330 335 340	1233
CTT GAC CAA TGG CAA TTC CAC CAA CCA ATT ATC GCG TGC TCG CTC ATC Leu Asp Gln Trp Gln Phe His Gln Pro Ile Ile Ala Cys Ser Leu Ile 345 350 355	1281
GGT ATT GTT ACC GGT CAT GCT TCT GCA GGG ATT ATC CTC GGT GGT TCA Gly Ile Val Thr Gly His Ala Ser Ala Gly Ile Ile Leu Gly Gly Ser 360 365 370	1329
CTT CAA TTG ATC GCT CTT GGT TGG GCT AAC GTT GGT GCC GCT GTC GCA Leu Gln Leu Ile Ala Leu Gly Trp Ala Asn Val Gly Ala Ala Val Ala 375 380 385 390	1377
CCC GAT GCT GCC CTT GCC TCT ATC GCA TCA TCT ATC TTG ATG GTT CAA Pro Asp Ala Ala Leu Ala Ser Ile Ala Ser Ser Ile Leu Met Val Gln 395 400 405	1425
TCA AAT AAC TTT GAC TTG ACT CAC ATC ATG GGT ACT ATC GTT CCT GCT Ser Asn Asn Phe Asp Leu Thr His Ile Met Gly Thr Ile Val Pro Ala 410 415 420	1473

GCT ATC TTG CTT GCA ACT GCT GGT CTT GTA TTG ACT ACT CTT GTA CGT	1521
Ala Ile Leu Leu Ala Thr Ala Gly Leu Val Leu Thr Thr Leu Val Arg	
425 430 435	
ATG CTT TCA GTT GTG CTC GTT CAC CAA GCT GAC CGT GCT GCT GAA AAT	1569
Met Leu Ser Val Val Leu Val His Gln Ala Asp Arg Ala Ala Glu Asn	
440 445 450	
GGT TCA TAC TCA GGT GTT GAA ATG TGG CAC TTC ATC GCG CTT ATC TGT	1617
Gly Ser Tyr Ser Gly Val Glu Met Trp His Phe Ile Ala Leu Ile Cys	
455 460 465 470	
CAA GGT TTG CGT ATT GCT ATC CCT GCT GGA CTT CTT TTG GTT ATC TCA	1665
Gln Gly Leu Arg Ile Ala Ile Pro Ala Gly Leu Leu Leu Val Ile Ser	
475 480 485	
CCA GAT GCT ATC CAA AAA GCA CTT GCT GCT ATT CCT CCA GTT ATC TCT	1713
Pro Asp Ala Ile Gln Lys Ala Leu Ala Ala Ile Pro Pro Val Ile Ser	
490 495 500	
GGC GGT CTT GCT GTC GGT GGT GGG ATG GTT GTT GCC GTT GGT TAT GCA	1761
Gly Gly Leu Ala Val Gly Gly Gly Met Val Val Ala Val Gly Tyr Ala	
505 510 515	
ATG GTT ATC AAC CTT ATG GCT ACT CGT GAA GTA TGG CCA TTC TTC TTC	1809
Met Val Ile Asn Leu Met Ala Thr Arg Glu Val Trp Pro Phe Phe Phe	
520 525 530	
CTT GGT TTC GCT CTC GCA CCA ATC TCT GAA TTA ACA TTG ATT GCA ACT	1857
Leu Gly Phe Ala Leu Ala Pro Ile Ser Glu Leu Thr Leu Ile Ala Thr	
535 540 545 550	
GGT GTC CTC GGT GTT GTT ATC GCT ATC GTT TAC CTT AAC CTC CAA GCT	1905
Gly Val Leu Gly Val Val Ile Ala Ile Val Tyr Leu Asn Leu Gln Ala	
555 560 565	
TCT GGT GGT TCT GGA AAT GGT ACT GCA TCT TCA TCA GGT GAC CCA ATT	1953
Ser Gly Gly Ser Gly Asn Gly Thr Ala Ser Ser Ser Gly Asp Pro Ile	
570 575 580	
GGC GAC ATC TTG AAC GAC TAC TAAGAAAGGA GGATCTAAAA A ATG TCT GAA	2004
Gly Asp Ile Leu Asn Asp Tyr Met Ser Glu	
585 590	
AAT AAA GTA ACT CTT GAT AAG AAA ATC CGT CGT AGC GTT ATG TGG CGT	2052
Asn Lys Val Thr Leu Asp Lys Lys Ile Arg Arg Ser Val Met Trp Arg	
595 600 605	
TCA ATG TTC CTC CAA GGT TCT TGG AAC TAC GAA CGT ATG CAA AAT GGT	2100
Ser Met Phe Leu Gln Gly Ser Trp Asn Tyr Glu Arg Met Gln Asn Gly	
610 615 620	
GGT TGG GCT TAC TCG CTC ATT CCA GCA TTG AAA AAA CTC TAC CCT TCT	2148
Gly Trp Ala Tyr Ser Leu Ile Pro Ala Leu Lys Lys Leu Tyr Pro Ser	
625 630 635 640	
GGC GAA GAA GCT AAA GAA GCT TTG AAA CGT CAC TTG GAA TTC TTT AAT	2196
Gly Glu Glu Ala Lys Glu Ala Leu Lys Arg His Leu Glu Phe Phe Asn	
645 650 655	

ACT	CAC	CCA	TAC	GTT	GCC	GCT	CCT	ATC	ATC	GGT	GTA	ACT	CTT	GCC	CTT	2244
Thr	His	Pro	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	
			660					665					670			
GAA	GAA	GAA	CGT	GCT	AAC	GGT	GCT	GAT	ATC	GAT	GAT	GCC	GCT	ATT	CAA	2292
Glu	Glu	Glu	Arg	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	
			675				680					685				
GGG	GTT	AAA	GTT	GGT	ATG	ATG	GGT	CCT	CTT	GCC	GGT	ATC	GGT	GAC	CCT	2340
Gly	Val	Lys	Val	Gly	Met	Met	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Pro	
			690				695					700				
GTC	TTC	TGG	TTT	ACA	GTA	CGT	CCT	ATC	GTT	GGT	GCG	ATT	GCA	GCT	TCA	2388
Val	Phe	Trp	Phe	Thr	Val	Arg	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	
					710					715					720	
TTG	GCT	ACT	GGT	GGA	TCA	ATT	ATC	GCT	CCA	CTC	TTC	TTC	TTC	ATC	GTG	2436
Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Ala	Pro	Leu	Phe	Phe	Phe	Ile	Val	
				725					730					735		
TGG	AAC	GCT	ATC	CGT	ATC	GCT	TTC	TTG	TGG	TAC	ACT	CAA	GAA	TTT	GGT	2484
Trp	Asn	Ala	Ile	Arg	Ile	Ala	Phe	Leu	Trp	Tyr	Thr	Gln	Glu	Phe	Gly	
			740					745					750			
TAT	AAA	TCA	GGT	TCT	GCA	ATC	ACT	AAA	GAC	CTT	GGT	GGA	GGA	CTT	CTC	2532
Tyr	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Lys	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	
		755					760					765				
CAA	ACT	GTT	ACT	AAA	GGT	GCA	TCT	ATC	CTT	GGT	ATG	TTC	GTC	CTT	GGT	2580
Gln	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Gly	Met	Phe	Val	Leu	Gly	
			770				775				780					
GTA	TTG	ATT	CAA	CGT	TGG	GTA	ACA	ATT	AAC	TTT	AAT	GGT	CCT	AAC	GCT	2628
Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Trp	Val	Thr	Ile	Asn	Phe	Asn	Gly	Pro	Asn	Ala	
					790					795					800	
GTT	GTT	TCA	AAA	ATT	CCT	TTA	CAA	AAA	GGT	GCT	TAT	CTA	GAA	TTC	CCT	2676
Val	Val	Ser	Lys	Ile	Pro	Leu	Gln	Lys	Gly	Ala	Tyr	Leu	Glu	Phe	Pro	
				805					810					815		
AAA	GGT	TCT	GTA	TCT	GGT	ACA	CAA	CTT	CAT	GAT	ATT	CTT	GGT	CAA	GTT	2724
Lys	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu	His	Asp	Ile	Leu	Gly	Gln	Val	
			820					825					830			
GGT	AAC	AAA	CTT	TCT	CTT	GAT	CCT	ACA	AAA	GTA	ACT	TAC	CTT	CAA	GAT	2772
Gly	Asn	Lys	Leu	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	
			835				840					845				
AAC	TTG	AAT	CAA	TTG	ATT	CCT	GGT	CTT	GCT	GGT	TTG	CTT	ATC	ACA	TTC	2820
Asn	Leu	Asn	Gln	Leu	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Thr	Phe	
			850				855				860					
CTT	TGC	ATG	TGG	TTG	CTT	AAG	AAA	AAA	GTT	TCT	CCA	ATC	GTT	ATT	ATC	2868
Leu	Cys	Met	Trp	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Pro	Ile	Val	Ile	Ile	
					870					875					880	
TTT	GGT	CTC	TTC	GTC	GTG	GGT	ATC	CTC	GGT	CGA	TGG	GCT	CAA	ATC	ATG	2916
Phe	Gly	Leu	Phe	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Arg	Trp	Ala	Gln	Ile	Met	
				885					890						895	

## .INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:6

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:6

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:6

```

GACTTTATTA TCTTCAAAA GTTGATAGGT GTTTTTATTT CATCTGTAA AATTATTGTT 60
TACTTCTAGT TCAGAAGTAA GATTTTTTAT AAAATCTGTT AAGGAAATTT CTTAGTAACT 120
TAAATCTTCT CCGTTTGTCT AAATCACTTT TTTGTACCAG TCAAAGCCCC GTTTTTTGAT 180
ACGTTTATAA TCTTTATCTA TATAACAAA ACCATAACGT TTTTCAAAAC CTTCACGAGT 240
AGAGTAAAGG TCCGTGTCAG ACCATGTAAG ATAACCAATC ATTTCTACTC CCTCTTCAAC 300
CGTCTCTTTC ATACGAGCAA TATGGTCTGC TAAATACTTA ATTCTGTAAT CATCATTAAC 360
CGTTCCG
367

```

## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:7

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:7

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:7

```

TTCATTTTAT ACAAAGGAGT CCCA ATG ATA AAA GCA ATT GCC TTA GAA AAT 51
Met Ile Lys Ala Ile Ala Leu Glu Asn
1 5

GTT TGG TTA AAT TTT TCA GAT GAA ACA AAA GCG GCT TTC AAG AAA AAT 99
Val Trp Leu Asn Phe Ser Asp Glu Thr Lys Ala Ala Phe Lys Lys Asn
10 15 20 25

AAA GCT TAC CAG TTT CAA TTT AAA AAA GAA GAA GAG CTG ACA GAA TCA 147
Lys Ala Tyr Gln Phe Gln Phe Lys Lys Glu Glu Glu Leu Thr Glu Ser
30 35 40

GAT TTT CTG GAA ACA GAA GTA TTA GTT GGT CTG CCA AAG CCT GAT TTA 195
Asp Phe Leu Glu Thr Glu Val Leu Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp Leu
45 50 55

TTA GCA AAA TAT AAA AAT TTA AAA TGG CTC CAA CTT TTA TCA GCT GGG 243
Leu Ala Lys Tyr Lys Asn Leu Lys Trp Leu Gln Leu Leu Ser Ala Gly
60 65 70

ACC AAT GGT TAT ACT CAA GGA GCA AAT TTT CCT CAA GAG GTA GTT TTG 291
Thr Asn Gly Tyr Thr Gln Gly Ala Asn Phe Pro Gln Glu Val Val Leu
75 80 85

ACA AAT GCA ACA GGA ACT TAT GGA CTT ACG ATT TCT GAG CAT TTA CTA 339
Thr Asn Ala Thr Gly Thr Tyr Gly Leu Thr Ile Ser Glu His Leu Leu
90 95 100 105

ACA ATG GCT TTC GTT CTT CTA AGA AAA TTT GAC CTT TAT CAA AAA CAA 387
Thr Met Ala Phe Val Leu Leu Arg Lys Phe Asp Leu Tyr Gln Lys Gln
110 115 120

```

CAA GAA AAA GAA ATC TGG GAA AAT ATT GGT CAG ATT CAA TCT ATT TAT Gln Glu Lys Glu Ile Trp Glu Asn Ile Gly Gln Ile Gln Ser Ile Tyr 125 130 135	435
GGC TCA ACA GTA TTG GTT CAT GGT TTA GGT GAT ATT GGA AGT CAC TTT Gly Ser Thr Val Leu Val His Gly Leu Gly Asp Ile Gly Ser His Phe 140 145 150	483
GCA CAA AAG ATT CAA GCT TTG GGA GGT CAT GTC ATT GCA GTC AAA CGA Ala Gln Lys Ile Gln Ala Leu Gly Gly His Val Ile Ala Val Lys Arg 155 160 165	531
ACT GTT TAT GGT GAT GAA GAA TTT GCT GAT GAA GTC TAT GCC GAA ACT Thr Val Tyr Gly Asp Glu Phe Ala Asp Glu Val Tyr Ala Glu Thr 170 175 180 185	579
GAC CTA GAC AAA GTT TTA CCG AGA GCT GAT ATT ATT GCT TCA AGT GTC Asp Leu Asp Lys Val Leu Pro Arg Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser Val 190 195 200	627
CCT GGG ACC CAT GAA ACT TAT AAA TTA TTT AAT CAA GAA AAA TTT GAT Pro Gly Thr His Glu Thr Tyr Lys Leu Phe Asn Gln Glu Lys Phe Asp 205 210 215	675
TTA ATG AAA GAA AAT GCT ATT TTC CTA AAT GTT GGT CGG GGA ACA AAT Leu Met Lys Glu Asn Ala Ile Phe Leu Asn Val Gly Arg Gly Thr Asn 220 225 230	723
GTC GAT TTA GAA GCC TTG TGT GAT GCT CTT GAG TCT AAA AAA ATT GCT Val Asp Leu Glu Ala Leu Cys Asp Ala Leu Glu Ser Lys Lys Ile Ala 235 240 245	771
GGG GCA GGA ATT GAC GTG ACC GAC CCA GAA CCA TTG CCT AAA GGT CAC Gly Ala Gly Ile Asp Val Thr Asp Pro Glu Pro Leu Pro Lys Gly His 250 255 260 265	819
CGG GCT TGG CAT ACA GAA AGA CTA TTA ATC ACT CCT CAT GCT TCT GGC Arg Ala Trp His Thr Glu Arg Leu Leu Ile Thr Pro His Ala Ser Gly 270 275 280	867
GGT TAT ACT CTT CCT GAA ACA TGG CGT CGC TTT ATG AAA ATA TTG GAA Gly Tyr Thr Leu Pro Glu Thr Trp Arg Arg Phe Met Lys Ile Leu Glu 285 290 295	915
AAA AAT CTC GAT GCC TAT GCA AAT GGT AAG GAA TTG ACA AAT ATT GTT Lys Asn Leu Asp Ala Tyr Ala Asn Gly Lys Glu Leu Thr Asn Ile Val 300 305 310	963
GAT ATG AAA ACA GGA TAT AAA CGA AAT GCT CAC AAA Asp Met Lys Thr Gly Tyr Lys Arg Asn Ala His Lys 315 320 325	999



## INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:8

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:8

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:8

GAT ATT ATT GAT TGT AAT GCT GCT ATT GTA AAT GGT GGA GGT GCT CTC	48
Asp Ile Ile Asp Cys Asn Ala Ala Ile Val Asn Gly Gly Gly Ala Leu	
1 5 10 15	
CTT GGT TTT GCT ATG AAA TAC AAA ACC AAC AAT GAC CGT GTG GAA AAG	96
Leu Gly Phe Ala Met Lys Tyr Lys Thr Asn Asn Asp Arg Val Glu Lys	
20 25 30	
TTT TTT AAA GCT AAA CAA CTT CCA GAG GAA TAC ATA CGT GGT ATC AGC	144
Phe Phe Lys Ala Lys Gln Leu Pro Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Ile Ser	
35 40 45	
CGT GTT TAT GAT ACT CAA GAA AAT ATC GGT ATT GAC AGT GAC TTG ACC	192
Arg Val Tyr Asp Thr Gln Glu Asn Ile Gly Ile Asp Ser Asp Leu Thr	
50 55 60	
ATC TTC CCA GTG GAA TTA AAA GAT GAT TTC CCT GAC GGT TTG ACT ACA	240
Ile Phe Pro Val Glu Leu Lys Asp Asp Phe Pro Asp Gly Leu Thr Thr	
65 70 75 80	
ATT GCA CCA ATC TAT GGT GGT GGT ATG CGT CTT GGT TCT TTC ATT ATT	288
Ile Ala Pro Ile Tyr Gly Gly Gly Met Arg Leu Gly Ser Phe Ile Ile	
85 90 95	
TGG CGT AAC GAC CAT GAT TTT GTG GAC GAC GAC CTT ATC TTG GTT GAG	336
Trp Arg Asn Asp His Asp Phe Val Asp Asp Asp Leu Ile Leu Val Glu	
100 105 110	
ATT GCA TCT ACA GTA GTT GGT TTG CAA TTG TTG CAT CTT CAA ACA GAA	384
Ile Ala Ser Thr Val Val Gly Leu Gln Leu Leu His Leu Gln Thr Glu	
115 120 125	
AAC TTG GAA GAA ACG ATT CGT AAA CAA ACA GCT ATT AAT ATG GCT ATT	432
Asn Leu Glu Glu Thr Ile Arg Lys Gln Thr Ala Ile Asn Met Ala Ile	
130 135 140	
AAT ACC TTG TCT TAC TCA GAA ATC AAG GCA GTT TCA GCT ATC TTG AAT	480
Asn Thr Leu Ser Tyr Ser Glu Ile Lys Ala Val Ser Ala Ile Leu Asn	
145 150 155 160	
GAG TTG GAC GGT TTA GAA GGT CGT TTG ACA GCC TCT GTT ATC GCG GAC	528
Glu Leu Asp Gly Leu Glu Gly Arg Leu Thr Ala Ser Val Ile Ala Asp	
165 170 175	
CGT ATC GGA ATT ACT CGT TCT GTT ATT GTT AAT GCT CTT CGT AAA TTA	576
Arg Ile Gly Ile Thr Arg Ser Val Ile Val Asn Ala Leu Arg Lys Leu	
180 185 190	

GAA TCA GCT GGT ATT ATT GAA AGT CGT TCG CTT GGT ATG AAA GGC ACT 624  
 Glu Ser Ala Gly Ile Ile Glu Ser Arg Ser Leu Gly Met Lys Gly Thr  
           195                                  200                                  205

TAC CTC AAA GTC CTT AAC GAA GGT ATC TAC GAC AAA TTG AAA GAA TAC 672  
 Tyr Leu Lys Val Leu Asn Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Lys Glu Tyr  
           210                                  215                                  220

# INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:9

## i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:9

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

## xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:9

ATG GCA AAT TTG CTT GAT AAA ACA CGT AAA ATT ACT TCT ATC TTG CAA 48  
 Met Ala Asn Leu Leu Asp Lys Thr Arg Lys Ile Thr Ser Ile Leu Gln  
           1                                  5                                  10                                  15

CGC TCA GTA GAT AGT TTG GAA GGA GAT CTT CCA TAC AAC AAC ATG GCT 96  
 Arg Ser Val Asp Ser Leu Glu Gly Asp Leu Pro Tyr Asn Asn Met Ala  
                                   20                                  25                                  30

GCT CAG TTG GCA GAT ATT ATT GAT TGT AAT GCT GCT ATT GTA AAT GGT 144  
 Ala Gln Leu Ala Asp Ile Ile Asp Cys Asn Ala Ala Ile Val Asn Gly  
                                   35                                  40                                  45

GGA GGT GCT CTC CTT GGT TTT GCT ATG AAA TAC AAA ACC AAC AAT GAC 192  
 Gly Gly Ala Leu Leu Gly Phe Ala Met Lys Tyr Lys Thr Asn Asn Asp  
           50                                  55                                  60

CGT GTG GAA AAG TTT TTT AAA GCT AAA CAA CTT CCA GAG GAA TAC ATA 240  
 Arg Val Glu Lys Phe Phe Lys Ala Lys Gln Leu Pro Glu Glu Tyr Ile  
           65                                  70                                  75                                  80

CGT GGT ATC AGC CGT GTT TAT GAT ACT CAA GAA AAT ATC GGT ATT GAC 288  
 Arg Gly Ile Ser Arg Val Tyr Asp Thr Gln Glu Asn Ile Gly Ile Asp  
                                   85                                  90                                  95

AGT GAC TTG ACC ATC TTC CCA GTG GAA TTA AAA GAT GAT TTC CCT GAC 336  
 Ser Asp Leu Thr Ile Phe Pro Val Glu Leu Lys Asp Asp Phe Pro Asp  
                                   100                                  105                                  110

GGT TTG ACT ACA ATT GCA CCA ATC TAT GGT GGT GGT ATG CGT CTT GGT 384  
 Gly Leu Thr Thr Ile Ala Pro Ile Tyr Gly Gly Gly Met Arg Leu Gly  
           115                                  120                                  125

TCT TTC ATT ATT TGG CGT AAC GAC CAT GAT TTT GTG GAC GAC GAC CTT 432  
 Ser Phe Ile Ile Trp Arg Asn Asp His Asp Phe Val Asp Asp Asp Leu  
           130                                  135                                  140

ATC TTG GTT GAG ATT GCA TCT ACA GTA GTT GGT TTG CAA TTG TTG CAT 480  
 Ile Leu Val Glu Ile Ala Ser Thr Val Val Gly Leu Gln Leu Leu His  
           145                                  150                                  155                                  160

CTT CAA ACA GAA AAC TTG GAA GAA ACG ATT CGT AAA CAA ACA GCT ATT 528  
 Leu Gln Thr Glu Asn Leu Glu Glu Thr Ile Arg Lys Gln Thr Ala Ile

[illegible]